

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Jana Písačková

Charakterizace rekombinantního fragmentu
protilátky proti znaku CD3

Characterization of recombinant fragment
of an antibody against CD3 marker

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Pavlína Řezáčová, Ph.D.

Praha, 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 03.05.2011

Podpis

Tato práce byla vypracována v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. a byla finančně podporována Centrem cílených terapeutik.

Ráda bych poděkovala především své školitelce RNDr. Pavlíně Řezáčové, Ph.D. za vstřícné a trpělivé vedení diplomové práce, za její cenné rady a všestrannou pomoc a podporu nejen v oblasti proteinové krystalografie.

Můj velký dík patří RNDr. Vlastimilu Královi, Ph.D., který mi ochotně předával své zkušenosti s monoklonálními protilátkami. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Milanovi Fábrymu, CSc., Ing. Ireně Siegllové, Mgr. Pavlu Maderovi, Ph.D. a také Jitce Kredbové a Věře Mrkvičkové za cenné rady a ochotnou pomoc.

RNDr. Magdaleně Hořejší a Janě Starkové děkuji za rady při práci s tkáňovými kulturami, Doc. RNDr. Jiřímu Bryndovi, CSc. a Ing. Petrovi Pachlovi za pomoc v oblasti proteinové krystalografie a dynamického rozptylu světla, Ing. Janě Günterové za měření na průtokovém cytometru a Ing. Michalovi Doležalovi a Ing. Kateřině Procházkové, Ph.D. za rady ohledně diferenční skenovací fluorimetrie.

Kolektivu laboratoře velmi děkuji za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině a Jiříkovi za všestrannou pomoc a podporu během celého studia.

Abstrakt

Monoklonální protilátka MEM-57 rozpoznává antigen CD3, exprimovaný na T-lymfocytech periferní krve. Komplex membránových glykoproteinů CD3 asociuje s receptorem T-buněk a je zodpovědný za přenos aktivačního signálu. Protilátka MEM-57 má proto výrazný diagnostický a terapeutický potenciál. Mohla by být využita v diagnostice autoimunitních onemocnění, při klasifikaci T-buněčných leukemií nebo jako imunosupresivum při transplantacích. Nejslibnějším terapeutickým využitím protilátky MEM-57 by však byla konstrukce protilátkového fragmentu ve formátu BiTE (z angl. bispecific T-cell engager) pro léčbu rakoviny. Při konstrukci tohoto protilátkového formátu by byl jednořetězcový variabilní fragment protilátky MEM-57 (scFv, z angl. single-chain fragment, variable) spojen v jedné molekule s fragmentem scFv protilátky proti nádorovému antigenu.

Tato práce je zaměřena na charakterizaci rekombinantního fragmentu scFv protilátky MEM-57. K heterologní expresi byl použit kmen *E. coli* BL21 (DE3) a vektor pET22b(+) kódující sekvenci pelB pro akumulaci produktu v periplasmatickém prostoru, vlastní rekombinantní protilátkový fragment scFv MEM-57, epitop c-myc a histidinovou kotvu. Byl vypracován dvoukrokový purifikační protokol zahrnující chelatační a ionexovou chromatografii, který poskytuje dostatečné množství čistého a aktivního proteinu. Antigen vazebná aktivita scFv MEM-57 byla ověřena pomocí průtokové cytometrie.

Pro konstrukci protilátkového fragmentu ve formátu BiTE nebo pro humanizaci protilátky by bylo užitečné znát strukturu scFv MEM-57. Proto byly zahájeny krystalografické strukturní studie. Byla provedena prekrystalizační analýza scFv MEM-57, zaměřená na zvýšení pravděpodobnosti krystalizace proteinu. Biofysikální vlastnosti scFv MEM-57 byly analyzovány pomocí gelové chromatografie a dynamického rozptylu světla. Diferenční skenovací fluorimetrie byla využita pro nalezení vhodného složení výchozího pufru pro krystalizaci, které by bylo optimální z hlediska stability a homogenity proteinu, tudíž optimální pro krystalizaci. Positivní efekt složení výchozího pufru na krystalizaci byl potvrzen prvními krystalizačními pokusy. Byly provedeny optimalizační krystalizační pokusy, které vedly ke zlepšení kvality krystalů scFv MEM-57, avšak pro získání krystalů vhodných pro rentgenostrukturní analýzu je nutné v optimalizačních pokusech dále pokračovat.

Abstract

Monoclonal antibody MEM-57 recognizes CD3 antigen expressed on peripheral blood T-lymphocytes. CD3 surface glycoprotein complex associates with T-cell receptor and is responsible for the transduction of activation signal. Antibody MEM-57 has, therefore, a large diagnostic and therapeutic potential. It could be used in autoimmune diseases diagnostics, for classification of T-cell leukemias and, as an immunosuppressant, in transplantation. The most promising therapeutic use of MEM-57 antibody would be the construction of a “Bispecific T-cell Engager” (BiTE) antibody format with potential application in cancer therapy. In this format, single-chain variable fragment (scFv) of MEM-57 would be fused with an anti-tumor antigen scFv.

The thesis is focused on biochemical and biophysical characterization of MEM-57 antibody scFv fragment. Recombinant antibody fragment scFv MEM-57, equipped with the pelB leader sequence, c-myc tag and His₅ tag, was produced from a pET22b(+) vector into the periplasmic space of *E. coli* BL21 (DE3). Two-step purification protocol, employing nickel chelation affinity chromatography and ion-exchange chromatography, was developed to obtain high yield of pure protein. The antigen binding activity of scFv MEM-57 was confirmed by flow cytometry.

Structural information on scFv MEM-57 would be of help in the BiTE antibody format construction and also in attempts to humanize the antibody. Thus crystallographic studies were initiated. Pre-crystallization analysis of scFv MEM-57 aiming at improvement of protein crystallizability was performed. Biophysical properties of protein samples were analyzed using size-exclusion chromatography and dynamic light scattering. Differential scanning fluorimetry was used to find the composition of the starting buffer optimal for protein stability, homogeneity and, therefore, crystallizability. The positive effect of the optimal starting buffer composition was confirmed by the results of crystallization trials. Crystallization optimization trials yielded scFv MEM-57 crystals of improved quality, however, further optimization is needed to obtain crystals suitable for X-ray diffraction analysis.

(In Czech)

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	6
Seznam použitých symbolů a zkratk.....	8
1 Úvod.....	11
2 Úvod do problematiky	12
2.1 Protilátky.....	12
2.1.1 Struktura a třídy imunoglobulinů.....	12
2.1.2 Fragmenty protilátek.....	13
2.1.3 Monoklonální protilátky	14
2.1.4 Rekombinantní fragmenty protilátek a jejich příprava	15
2.1.5 Terapeutický význam monoklonálních protilátek a jejich fragmentů	17
2.2 Protilátka MEM-57 proti komplexu CD3	21
2.2.1 Receptor T-buněk a komplex CD3	21
2.2.2 Protilátka MEM-57	23
3 Cíl práce.....	25
4 Materiál a metody	26
4.1 Materiál.....	26
4.1.1 Bakteriální kmeny a buněčné kultury	26
4.1.2 Plasmidy a kultivační média	26
4.1.3 Protilátky.....	26
4.1.4 Chemikálie	27
4.1.5 Ostatní materiál.....	28
4.2 Přístroje a vybavení	29
4.3 Experimentální metody.....	31
4.3.1 Expres a izolace rekombinantních fragmentů protilátek.....	31
4.3.1.1 Rekombinantní expres.....	31
4.3.1.2 Izolace	32
4.3.2 Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance.....	32
4.3.3 Dialýza a ultrafiltrace.....	32

4.3.4	Chromatografické metody	33
4.3.4.1	Chelatační chromatografie	33
4.3.4.2	Ionexová chromatografie	33
4.3.4.3	Gelová permeační chromatografie	34
4.3.5	Elektromigrační metody	34
4.3.5.1	SDS-PAGE	34
4.3.5.2	Western blot s imunodetekcí	36
4.3.6	Průtoková cytometrie	36
4.3.7	Diferenční skenovací fluorimetrie	37
4.3.8	Dynamický rozptyl světla	38
4.3.9	Krystalizace difusí par	39
4.3.9.1	Metoda sedící kapky	39
4.3.9.2	Metoda visící kapky	39
4.3.10	Krystalizace v kapiláře	40
5	Výsledky	42
5.1	Příprava scFv MEM-57 rekombinantní exprese v <i>Escherichia coli</i>	42
5.1.1	Heterologní exprese	43
5.1.2	Isolace	44
5.1.3	Purifikace	45
5.2	Funkční charakterizace scFv MEM-57	48
5.2.1	Průtoková cytometrie	48
5.3	Charakterizace biofyzikálních vlastností scFv MEM-57	50
5.3.1	Analytická gelová chromatografie	50
5.3.2	Diferenční skenovací fluorimetrie	52
5.3.3	Dynamický rozptyl světla	55
5.4	Krystalizace scFv MEM-57	56
5.4.1	Hledání krystalizačních podmínek	56
5.4.2	Optimalizace krystalizace	58
5.4.2.1	Optimalizace krystalizace varianty H9Ala-H11Leu	58
5.4.2.2	Optimalizace krystalizace varianty H9Gly-H11Pro	60
6	Diskuse	64
7	Závěr	67
	Seznam použité literatury	68

Seznam použitých symbolů a zkratek

(Gly ₄ Ser) ₃	obvyklá sekvence spojovacího peptidu scFv
(Gly ₄ Ser) ₄	sekvence spojovacího peptidu scFv MEM-57
A _{280nm}	absorbance při vlnové délce 280 nm
AA	akrylamid
ADCC	buňkami zprostředkovaná cytotoxicita závislá na protilátkách (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)
ADEPT	imunoterapeutická metoda založená na konjugátu protilátky s enzymem (Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy)
AV ČR	Akademie věd České republiky
Bicin	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycin
BIS	N,N'-methylen-bis(akrylamid)
Bis-scFv	kovalentní dimer scFv
BiTE	bispecifický dimer scFv (Bispecific T-cell Engager)
BL21 (DE3)	BL21 kmen <i>E. coli</i> s fágem DE3 používaný pro rekombinantní expresi
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CD	názvosloví molekul imunitního systému (Cluster of Differentiation)
CD3ε, δ, γ, ζ, η	řetězce komplexu CD3
CDC	cytotoxicita závislá na komplementu (Complement Dependent Cytotoxicity)
cDNA	komplementární DNA
CDR	úseky Ig zodpovědné za vazbu antigenu (Complementarity Determining Regions)
CL	konstantní doména lehkého řetězce imunoglobulinu
c-myc	protoonkoprotein regulující transkripci, buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptosu
COS	buněčná linie odvozená od opičích ledvinných buněk
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsFv	Fv stabilizovaný disulfidovým můstkem (disulfide-stabilized Fv)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ETG	ethyl-β-D-thiogalaktosid
F(ab') ₂	fragment vázající antigen (Fragment, antigen binding) vzniklý pepsinovým štěpením Ig
F1, F2	frakce 1 a frakce 2 scFv MEM-57 z ionexové chromatografie
Fab	fragment vázající antigen (Fragment, antigen binding) vzniklý papainovým štěpením Ig
Fab'	fragment vázající antigen (Fragment, antigen binding) vzniklý redukcí F(ab') ₂
FACS	průtoková cytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting)

Fc	krystalizující fragment (Fragment, crystallizable) vzniklý pepsinovým štěpením Ig
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FPLC	provedení chromatografie (Fast Protein Liquid Chromatography)
Fv	variabilní fragment (Fragment, variable)
GAM	polyklonální kozi protilátka proti myším Ig (Goat Anti Mouse)
H9, H11	posice 9 a 11 ve variabilní doméně těžkého řetězce protilátky
H9Ala-H11Leu	varianta scFv MEM-57
H9Gly-H11Pro	varianta scFv MEM-57
HEK-293	buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinných buněk (Human Embryonic Kidney)
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
His ₅	histidinový pentapeptid
hPx	křenová peroxidasa (horseradish Peroxidase)
hsFv	Fv stabilizovaný helixem (helix-stabilized Fv)
CH	konstantní doména těžkého řetězce imunoglobulinu
CHO	buněčná linie odvozená od buněk křeččích vaječníků (Chinese Hamster Ovary)
Ig	imunoglobulin
IgG	imunoglobulin třídy G
IgG2a	subtyp imunoglobulinu G
IL-2	interleukin 2
IMDM	médium pro buněčné kultury odvozené od lidských leukocytů (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktosid
ITAM	tyrosinový aktivační motiv (Immunoglobulin receptor family Tyrosine-based Activation Motif)
<i>lacI</i>	represor
<i>lacI</i> ^q	promotor
LB	Luria-Bertani
M	molární koncentrace [mol/l]
MAb	monoklonální protilátka (Monoclonal Antibody)
MEM-57	monoklonální protilátka proti CD3
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
Nck	adaptorový protein (Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein)
Ni-CAM HC	nosič pro chelatační chromatografii (Nickel Chelate Affinity Matrix, High Capacity)
NK	přirozený zabíječ (Natural Killer)
OD _{550nm}	optická hustota při vlnové délce 550 nm

OKT3	monoklonální protilátka proti CD3
ot.	otáčky
PBS	fysiologický roztok pufrovaný fosfátem (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PEG	polyethylenglykol
pelB	signální peptid pro transport proteinu do periplasmy <i>E. coli</i> (Bacterial pectate lyase)
pET22b(+)	expresní vektor
pH	vodíkový exponent (potential of Hydrogen)
pI	isoelektrický bod (Isoelectric point)
p _{lacUV5}	promotor
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
pscFv MEM-57	expresní plasmid pro přípravu scFv MEM-57
RNA	ribonukleová kyselina
scFv	jednořetězcový variabilní fragment (single chain Fragment, variable)
SDR	aminokyselinové zbytky zodpovědné za antigenní specifitu Ig (Specificity Determining Residues)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
src	rodina protein tyrosin kinas (sarcoma)
T7	druh bakteriofága
TCR	receptor T-buněk (T-Cell Receptor)
TCR α , β , γ , δ	řetězce receptoru T-buněk
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
T _m	teplota denaturace
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÚOCHB	Ústav organické chemie a biochemie
v. v. i.	veřejná výzkumná instituce
v/v	objemová procenta
VH	variabilní doména těžkého řetězce imunoglobulinu
VL	variabilní doména lehkého řetězce imunoglobulinu
w/v	procenta hmotnost/objem
WB	příčný elektroforetický přenos proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu (Western Blot)
ZAP-70	protein tyrosin kinasa (Zeta-chain-Associated Protein kinase 70)

1 Úvod

Od roku 1906, kdy Paul Ehrlich poprvé použil pojem imunoterapie, došlo k rozvoji metod proteinového inženýrství a molekulární biologie, což v poslední době umožnilo naplnění jeho vize použití protilátek k léčbě rakoviny [1]. Na trhu se objevuje stále více cílených terapeutik na bázi monoklonálních protilátek, především ve formě rekombinantních fragmentů, a mnohé další terapeutické protilátky jsou ve fázi klinických testů [2]. Nově se rozvíjející oblast takzvaného „protilátkového inženýrství“ se zabývá přípravou a modifikací protilátkových fragmentů, které dosahují požadované specifity, afinity a případně i farmakodynamických vlastností.

Protilátka MEM-57, rozpoznávající leukocytární znak CD3, má diagnostický a terapeutický potenciál. Mohla by být využita v diagnostice autoimunitních onemocnění, při klasifikaci T-buněčných leukemií nebo jako imunosupresivum v terapii odhojovacích krizí při transplantacích [3]. Fragment scFv protilátky MEM-57 by mohl být využit pro konstrukci protilátkového fragmentu ve formátu BiTE.

V Centru cílených terapeutik byla získána hybridomová linie MEM-57 z laboratoře Prof. Hořejšího na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. a ve školící laboratoři byly zkonstruovány fragmenty scFv protilátky MEM-57. Předmětem této práce je jejich charakterizace, která podá informace potřebné pro konstrukci protilátkového fragmentu ve formátu BiTE.

2 Úvod do problematiky

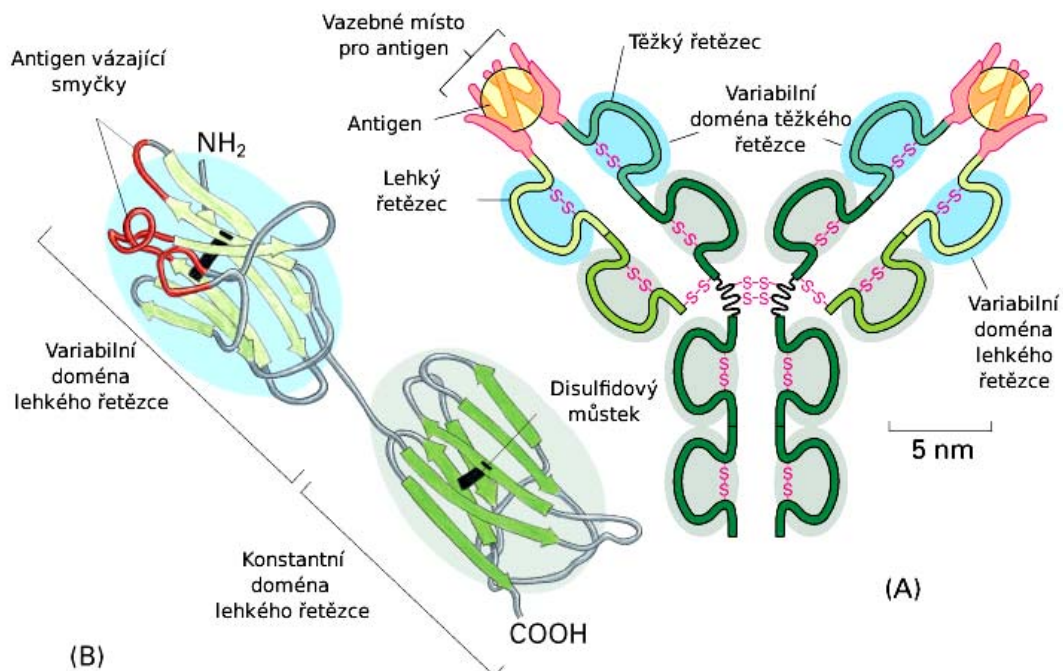
2.1 Protilátky

Protilátky, jedny ze základních molekul imunitního systému, se podílí na udržení homeostasy v organismu díky své schopnosti specificky rozpoznat cizorodé struktury patogenů, ale i vlastních poškozených nebo jiným způsobem pozměněných buněk [4].

Chemické struktury, proti kterým jsou protilátky specificky cíleny, se nazývají antigeny. Molekula protilátky rozpoznává a váže v molekule antigenu pouze určitý strukturní nebo sekvenční motiv, takzvaný epitop. Vazba protilátky na epitop antigenu má nekovalentní charakter s převahou vodíkových můstků, van der Waalsových sil, iontových a hydrofobních interakcí, její energie je přibližně 65 kJ/mol a lze ji popsat pomocí disociační konstanty imunokomplexu, která se typicky pohybuje v řádu 10^{-10} mol/l. Interakce celých polyvalentních molekul protilátek a antigenů je charakterizována aviditou. Interakce antigenu s protilátkou, takzvaná opsonizace, vede k rozvoji dalších imunitních dějů a ve výsledku až k odstranění antigenu z organismu [4-6].

2.1.1 Struktura a třídy imunoglobulinů

Protilátky, objevené v roce 1890 Emilem von Behringem [1], jsou glykoproteiny sekretované plasmatickými buňkami do krevního séra, kde tvoří až 20 % všech bílkovin. Typická molekula imunoglobulinu se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců, které jsou navzájem propojeny disulfidovými můstky. Každý z řetězců obsahuje ve své N-koncové oblasti variabilní doménu, složenou ze tří hypervariabilních smyček CDR (z angl. complementarity determining regions). Smyčky variabilních domén lehkého a těžkého řetězce spolu tvoří vazebné místo pro antigen a určují tak specifitu protilátky. Tři až čtyři konstantní domény těžkého řetězce a jedna konstantní doména řetězce lehkého zastávají v molekule imunoglobulinu efektorovou úlohu a jejich glykosylace je zodpovědná za relativně vysokou stabilitu molekuly imunoglobulinu [1, 4-6]. Struktura typické molekuly IgG je schematicky znázorněna na obrázku 1 (str. 13).



Obrázek 1: (A) schéma topologie molekuly IgG s barevně odlišenými variabilními a konstantními doménami jednotlivých řetězců, růžově zapsanými disulfidovými můstky a černou pantovou oblastí (B) detail trojrozměrné struktury lehkého řetězce; šipkami je znázorněna struktura skládaného listu Na obrázku není znázorněna glykosylace konstantní domény těžkého řetězce.

Převzato a upraveno 26.12.2008 z:

http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/ecb_images/04_32_antibody.jpg

U většiny savců je podle isotypu těžkého řetězce (γ , α , ϵ , δ , a μ) definováno pět tříd imunoglobulinů (G, A, E, D a M). Řetězce γ a α obsahují tři a řetězce ϵ , δ a μ čtyři konstantní domény. U člověka lze dále rozlišit čtyři subtypy řetězce γ a dva subtypy řetězce α . V případě lehkých řetězců jsou známy dva strukturně i funkčně velmi podobné isotypy (κ a λ), které se párují libovolně se všemi isotypy těžkých řetězců. Imunoglobuliny jednotlivých tříd se liší svým výskytem v organismu a především svou funkcí [4].

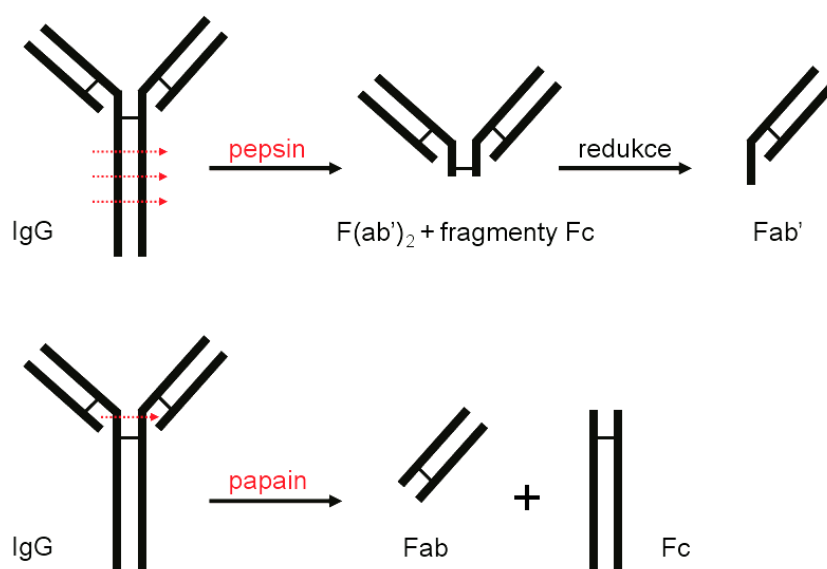
2.1.2 Fragmenty protilátek

Molekulu imunoglobulinu lze proteolyticky rozštěpit na různé typy fragmentů, v závislosti na typu štěpené molekuly, na použitém enzymu a podmínkách štěpení, zejména pH. K proteolyse dochází nejčastěji ve flexibilní pantové oblasti [7].

Pepsin štěpí při pH 4,0 – 4,5 C-koncový okraj pantové oblasti za vzniku dvouvazného fragmentu $F(ab')_2$ (z angl. fragment, antigen binding) a fragmentu Fc (z angl.

fragment, crystallizable), který je pepsinem dále štěpen na menší fragmenty. Fragment $F(ab')_2$ lze kontrolovanou redukcí upravit na jednovazný fragment Fab' [8]. Papain štěpí N-koncový okraj pantové oblasti za vzniku dvou jednovazných fragmentů Fab a fragmentu Fc [9]. Štěpení molekuly IgG pepsinem a papainem je schematicky znázorněno na obrázku 2.

Další z fragmentů, takzvaný fragment F_v (z angl. fragment, variable), lze připravit štěpením fragmentu Fab' pepsinem. Fragment F_v obsahuje pouze vzájemně nekovalentně vázané variabilní domény lehkého a těžkého řetězce a jedná se tedy o nejmenší protilátkový fragment, který si zachovává antigen vazebnou aktivitu. Jeho asociační konstanta je srovnatelná s konstantou výchozího Fab' fragmentu [10]. Místa proteolytického zásahu však nejsou v tomto případě příliš dobře přístupná, a proto je tento typ fragmentů v současnosti připravován převážně rekombinantně [8].



Obrázek 2: Enzymové štěpení molekuly IgG na typické fragmenty
Červenými šipkami jsou naznačena místa zásahu jednotlivých proteolytických enzymů.

2.1.3 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky pochází z jediného klonu plasmatických buněk, mají tudíž totožnou strukturu, afinitu i aviditu. V savčím organismu se hladina jedné konkrétní monoklonální protilátky výrazně zvýší v případě nádoru plasmatických buněk, takzvaného myelomu [4]. Myelomové buňky lze využít k přípravě monoklonálních protilátek *in vitro* metodou podle Köhlera a Milsteina z roku 1975, za kterou byla roku 1984 udělena

Nobelova cena v oboru fyziologie a medicíny [11, 12]. Podstatou této metody je *in vitro* fúze sleziných B-lymfocytů myši imunizované vybraným antigenem, proti kterému má být protilátka cílena, s myšími buňkami myelomové linie. Selekcí klonů dceřiných buněk, produkujících protilátku se správnou specifitou, vzniká takzvaná hybridomová linie, která má kromě schopnosti tvorby monoklonálních protilátek navíc i schopnost neomezeného dělení [1, 12]. Produkce protilátek v hybridomových kulturách může být obtížná, proto někdy bývají hybridomové buňky vpravovány do břišní dutiny myši a protilátky jsou produkovány do břišního ascitu [13]. Tímto způsobem jsou však získávány pouze myší monoklonální protilátky, čistě lidské protilátky lze připravovat v lidských hybridomových kulturách [14] nebo v transgenních myších [15].

Köhlerova a Milsteinova hybridomová technologie přípravy monoklonálních protilátek výrazně napomohla ke studiu genů kódujících imunoglobulinové řetězce a jejich domény, což umožnilo přípravu protilátek a zejména jejich fragmentů s využitím rekombinantních technologií [1].

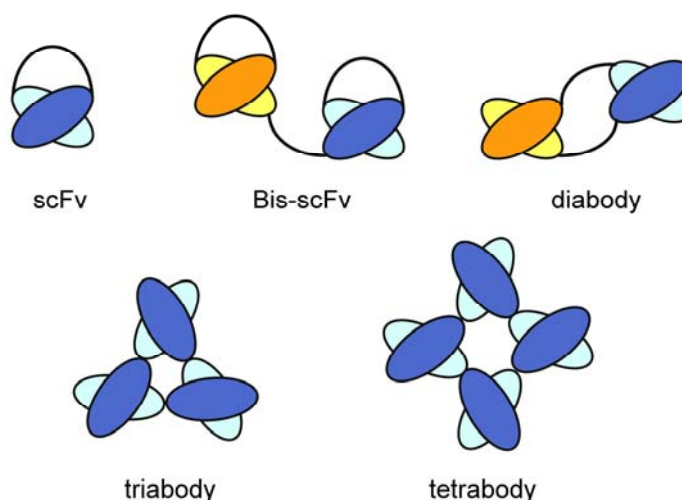
2.1.4 Rekombinantní fragmenty protilátek a jejich příprava

Rozvoj rekombinantních technologií otevřel cestu k přípravě mnoha dalších typů protilátkových fragmentů, které nelze připravit proteolysou imunoglobulinů. Návrh takovýchto fragmentů většinou vychází od fragmentu Fv, jehož dvě domény jsou vzájemně vázané pouze nekovalentně. Tuto interakci je vhodné stabilizovat krátkým spojovacím peptidem za vzniku jednořetězcového variabilního fragmentu scFv (z angl. single chain fragment, variable) [16, 17]. Spojovací peptid má nejčastěji sekvenci (Gly₄Ser)₃ [17], je tedy ohebný a hydrofilní [18]. V závislosti na délce spojovacího peptidu mohou vznikat různé stupně nekovalentních multimerů fragmentů scFv [19, 20]. Výhodou fragmentů scFv proti větším fragmentům z hlediska jejich terapeutického využití je efektivní průnik do cílové tkáně a rychlá eliminace z krevního oběhu [21, 22].

Dalšími možnostmi stabilizace fragmentu Fv je propojení jeho domén pomocí disulfidových můstků (dsFv, z angl. disulfide-stabilized Fv fragment) [23] anebo fúze domén s různými dimerizačními motivy (například hsFv, z angl. helix-stabilized Fv fragment [24]).

Pro zvýšení avidity jsou připravovány multimery fragmentů scFv. Nekovalentní multimerizace lze docílit zkracováním spojovacího peptidu za vzniku dimerních fragmentů

„diabody“ až tetramerních fragmentů „tetrabody“ [19, 20, 25, 26]. Kovalentní multimerizace se provádí propojením fragmentů scFv spojovacím peptidem za vzniku takzvaného Bis-scFv [27, 28]. Takovouto multimerizací fragmentů scFv lze připravit různé bispecifické dimerní fragmenty, které mají v poslední době velký terapeutický potenciál [29]. Výše popsané typy rekombinantních protilátkových fragmentů jsou zobrazeny na obrázku 3.



Obrázek 3: Rekombinantní protilátkové fragmenty
Modře jsou značeny scFv jedné specifity a oranžově scFv jiné specifity.

Pro rekombinantní přípravu protilátkových fragmentů je jako expresní systém často využívána *Escherichia coli* [18, 30-33], méně často kvasinka *Pichia pastoris* [34] či „bezbuňčný“ expresní systém [35]. Alternativou je produkce protilátkových fragmentů v buněčných kulturách odvozených od buněk *Drosophila melanogaster* [36] nebo v savčích buněčných kulturách, jako například CHO (z angl. chinese hamster ovary), COS (odvozené od opičích ledvinných buněk) [37] nebo HEK-293 (z angl. human embryonic kidney) [38]. Savčí expresní systémy poskytují správně poskládané a posttranslačně modifikované rekombinantní proteiny [37]. V poslední době se jako zajímavý alternativní expresní systém pro přípravu protilátek uplatňují i některé druhy rostlin [39].

Rekombinantní příprava protilátek umožňuje manipulovat na úrovni DNA strukturu protilátky, která tak získá optimální afinitu k antigenu. Většinou se pracuje s knihovnami variant protilátkových fragmentů, vzniklých vnášením cílených či náhodných mutací, a vhodný klon je následně selektován pomocí metody fágového [40] nebo ribosomálního displeje [41]. Základem těchto selekčních metod je fyzická vazba fenotypu (protilátky)

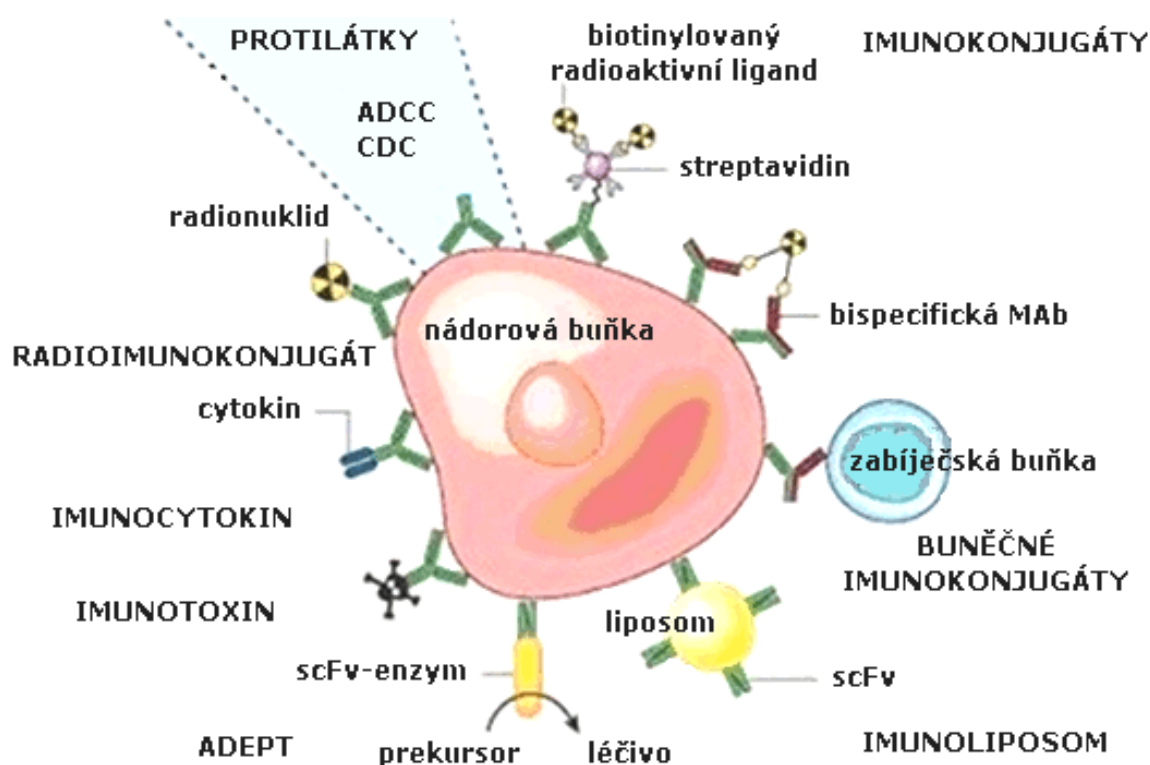
na svůj genotyp (DNA nebo RNA). Ze směsi pak lze izolovat protilátku o nejvyšší afinitě spolu s její DNA (RNA) na základě síly interakce s antigenem.

2.1.5 Terapeutický význam monoklonálních protilátek a jejich fragmentů

Protilátky, které selektivně rozpoznávají antigeny specifické pro nádorové buňky nebo antigeny s nádory asociované, mohou být využity pro diagnostiku a léčbu rakoviny. Terapie rakoviny, založená na protilátkách, je selektivně cílená, a proto dochází pouze k minimálnímu poškození zdravých tkání [1].

Jestliže jsou pro léčbu využívány protilátky samotné, jedná se o takzvanou buňkami zprostředkovanou cytotoxicitu závislou na protilátkách (ADCC, z angl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) nebo cytotoxicitu závislou na komplementu (CDC, z angl. complement dependent cytotoxicity). V těchto případech je využíváno efektorových funkcí Fc oblasti molekuly imunoglobulinu [1]. Samotné protilátky lze dále použít například k neutralisaci toxinů [42, 43].

Vhodnější terapeutickou strategií je konjugace protilátky s molekulou, kterou pak lze ve formě imunokonjugátu dopravit selektivně k cílovým buňkám. V praxi jsou používány například radioimunokonjugáty [44], imunocytokiny [45], imunotoxiny [46], imunoliposomy nebo také buněčné imunokonjugáty, nejčastěji s NK-buňkami. Imunokonjugáty se uplatňují také v metodě ADEPT (z angl. antibody directed enzyme prodrug therapy), kde imunoenzym aktivuje prekursor léčiva selektivně v cílové tkáni [47, 48]. Konjugace může být čistě kovalentní, nebo může být elegantně využita bispecifita protilátky či interakce vysoce afinní dvojice streptavidin - biotin [49]. Přehled výše uvedených způsobů využití protilátek pro terapii rakoviny je uveden na obrázku 4 (str. 18).



Obrázek 4: Terapeutické využití monoklonálních protilátek, jejich fragmentů a imunokonjugátů ADEPT (z angl. antibody directed enzyme prodrug therapy), ADCC (z angl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity), CDC (z angl. complement dependent cytotoxicity), MAb (z angl. monoclonal antibody)

Převzato a upraveno 17. 2. 2009 z: http://approachpilepsy.com/home/modules.php?name=Drugs-MM&page=Monoclonal_antibodies.html

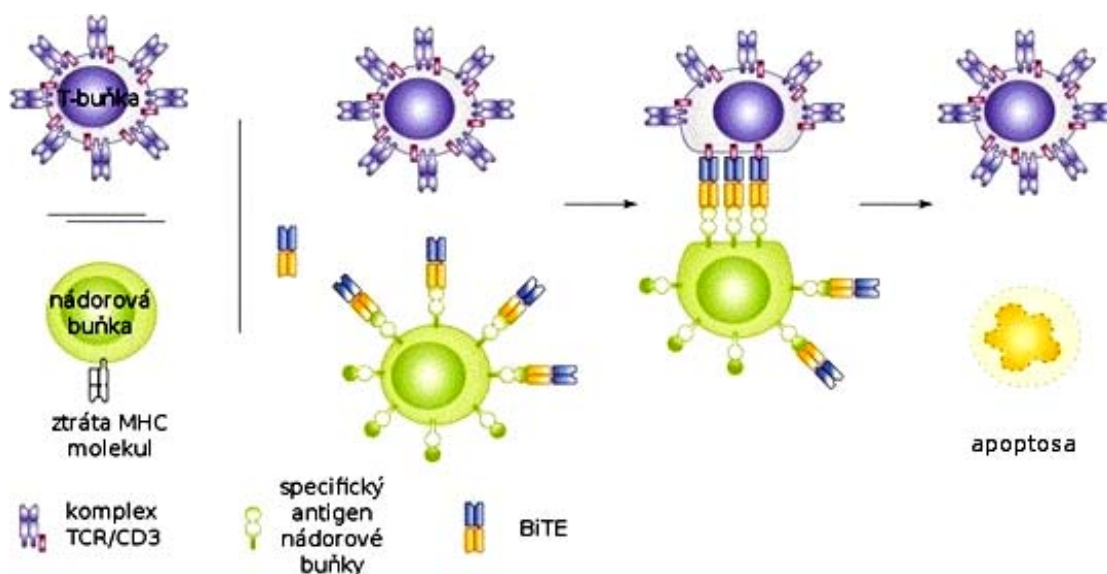
Terapeutické protilátky bývají odvozeny především od monoklonálních protilátek myšího původu. Ty vyvolávají u pacientů imunitní odpověď, která značně komplikuje léčbu [1]. Imunogenicitu myších protilátek lze snížit například metodou chimerizace molekuly imunoglobulinu, kdy jsou myší konstantní domény nahrazeny lidskými [50]. Nejúčinnější metodou deimunizace protilátek je jejich humanizace [51], při které jsou na lidskou imunoglobulinovou kostru „roubovány“ myší úseky CDR (z angl. complementarity determining regions) [52]. Minimálním provedením této metody je vnášení pouze těch aminokyselin ze sekvence myší protilátky, které odpovídají za rozpoznání antigenu (SDR, z angl. specificity determining residues) [53]. Terapeuticky nejvhodnější jsou samozřejmě protilátky čistě lidské, připravované v lidských hybridomových kulturách [14] či v transgenních myších [15].

Protilátkový fragment BiTE

Jedním z terapeuticky nejúspěšnějších bispecifických fragmentů je takzvaný BiTE (z angl. bispecific T-cell engager), tvořený dvěma fragmenty scFv propojenými flexibilním peptidem [54, 55]. Jeden z fragmentů váže znak CD3, který je exprimován na povrchu T-buněk, druhý fragment váže povrchový znak specifický pro nádorové buňky [54]. Tato bispecifita umožňuje spolu s malými rozměry a flexibilitou BiTE dostatečné přiblížení membrán efektorové T-buňky a cílové nádorové buňky, kterého s použitím větších formátů bispecifických protilátek docílit nelze [56, 57]. Přiblížení buněčných membrán vede ke vzniku lytické synapse, která je z hlediska velikosti a doménového uspořádání neodlišitelná od přirozené lytické synapse [58]. Tento těsný buněčný kontakt má za následek indukci apoptosy u nádorové buňky nezávisle na specifitě TCR (z angl. T-cell receptor) a bez nutnosti přítomnosti MHC molekul (z angl. major histocompatibility komplex) [58, 59], čímž jsou překonány únikové mechanismy nádorových buněk před imunitním dohledem [58]. BiTE tedy funguje jako jakási adaptorová molekula, která funkčně nahrazuje komplex MHC I - antigenní peptid - TCR [60]. Lyse nádorové buňky pomocí T-lymfocyty aktivovaného BiTE je schematicky znázorněna na obrázku 5 (str. 20).

Naivní T-buňky jsou aktivovány kontaktem s nádorovými buňkami, zprostředkovaným BiTE, a získají schopnost sériově navozovat apoptosu u cílových buněk, což nebylo dosud pozorováno u žádného jiného typu terapeutických protilátek [61]. Mechanismus aktivace není dosud zcela objasněn [54, 62]. Je však známo, že není závislá na další kostimulaci prostřednictvím CD28 nebo IL-2, jak je tomu v případě jiných typů bispecifických protilátek určených k navození T-buněčné imunitní odpovědi [54, 63]. V některých případech může inkubace T-lymfocytů s protilátkami proti CD28 zvýšit cytotoxický účinek BiTE [64], v jiných případech však nehraje roli [55].

Navození apoptosy u nádorových buněk pomocí T-lymfocytů aktivovaných BiTE probíhá většinou mechanismem závislým na působení perforinů a granzymu B, nikoliv cestou stimulace proapoptotických receptorů [64, 65]. Přednostně dochází k aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů a zvýšené expresi perforinů a granzymu B [64], byla však popsána i aktivace CD4⁺ T-lymfocytů, u kterých byla pozorována zvýšená exprese granzymu B a také následná schopnost lyse nádorových buněk [63, 66], která však nastala později než v případě CD8⁺ T-lymfocytů [55]. Pravděpodobně nejsou aktivovány ty T-lymfocyty, které jsou ve stavu anergie vyvolané působením nádorových buněk [66].



Obrázek 5: Indukce apoptosy u nádorové buňky prostřednictvím kontaktu s T-buňkou přes BiTE
Převzato a upraveno z [62].

Nespornou výhodou BiTE je jeho efektivita v nanomolárních [55] až pikomolárních koncentracích a při nízkých poměrech počtu efektorových buněk vůči buňkám nádorovým [54, 61, 64, 67]. Byla popsána o čtyři řády vyšší aktivita protilátky formátu BiTE v porovnání s formátem diabody za stejných experimentálních podmínek, což mimo jiné slibuje menší spotřebu protilátky na jeden cyklus terapie [57]. Důležitým faktorem je také rozdíl v afinitě jednotlivých částí BiTE ke svým antigenům. Anti-CD3 scFv část BiTE by měla mít řádově nižší afinitu k CD3, než jakou má druhá část BiTE vázající nádorový antigen, aby nedocházelo ke tvorbě buněčných shluků a nebyla tak omezena schopnost T-buněk zabíjet nádorové buňky sériově [61, 63]. V případě cílení BiTE proti antigenu asociovanému s nádory, který je přítomen i na zdravých buňkách a který vykazuje na nádorových buňkách pouze řádově vyšší expresi, je vhodné vybrat pro konstrukci BiTE scFv s nižší afinitou k antigenu. V případě extrémně vysoké afinity BiTE k takovému typu antigenu může docházet i k lysi zdravých buněk, exprimujících antigen v malé míře. Selektci scFv s vhodnou afinitou lze provést například metodou fágového displeje [63]. Vhodnější je však volit protilátku proti takovému epitopu antigenu asociovaného s nádory, který se například v důsledku alternativního sestřihu vyskytuje pouze na variantě antigenu specifické pro nádorové buňky [67]. Další výhodou formátu BiTE je jeho monomerní charakter [61]. Má pouze jedno vazebné místo pro CD3 a při jeho použití nedochází k vedlejším efektům, jako je CD3-specifická lyse T-buněk, která bývá pozorována

v případě celých imunoglobulinů cílených proti CD3 [68] nebo dimerních bispecifických protilátek jiného formátu [61, 63].

V současné době je v I. fázi klinických testů protilátkový fragment formátu BiTE, blinatumomab, cílený proti molekule CD19 přítomné na maligních B-buňkách [60, 69]. Bylo provedeno srovnání účinnosti fragmentu blinatumomab s chimerním imunoglobulinem rituximab, používaným k terapii některých typů nádorů B-buněk. Toto srovnání ukázalo, že blinatumomab dosahuje stejného terapeutického efektu již při koncentracích 150-krát až 450-krát nižších než rituximab [70]. Výhodou je vysoká pohyblivost T-lymfocytů, jejich rychlá proliferace, vysoká hladina exprese granzymů a schopnost sériové lyse nádorových buněk v přítomnosti BiTE. Takovéto vlastnosti nebyly dosud pozorovány u NK-buněk aktivovaných mechanismem ADCC, jak je tomu v případě protilátky rituximab. BiTE je tedy v současnosti jedním z terapeuticky nejslibnějších protilátkových formátů [70].

2.2 Protilátka MEM-57 proti komplexu CD3

2.2.1 Receptor T-buněk a komplex CD3

Receptor T-buněk (TCR, z angl. T-cell receptor) je heterodimer řetězců TCR α a TCR β , popřípadě TCR γ a TCR δ , jejichž sekvence a struktura se liší mezi jednotlivými klony T-lymfocytů. Tato strukturní variabilita zaručuje schopnost imunitního systému rozpoznat širokou škálu antigenních peptidů, presentovaných v komplexu s molekulami hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex) na povrchu antigen presentujících buněk. Podle specifity TCR dozrávajících T-lymfocytů vznikají 2 skupiny T-buněk. T-lymfocyty, exprimující znak CD8, rozpoznávají MHC třídy I v komplexu s antigenním peptidem, biosyntetizovaným uvnitř antigen presentující buňky. T-lymfocyty, exprimující znak CD4, rozpoznávají MHC třídy II v komplexu s endocytovaným antigenním peptidem [4, 71].

Receptor T-buněk je asociován s komplexem CD3, což je označení pro tři transmembránové jednotky, nekovalentní heterodimery CD3 $\epsilon\gamma$ a CD3 $\epsilon\delta$ a disulfidově vázaný homodimer CD3 $\zeta\zeta$, případně heterodimer CD3 $\zeta\eta$, kde CD3 η je alternativní sestřihová varianta CD3 ζ [72]. Tyto jednotky jsou zodpovědné za přenos informace

o vazbě komplexu antigenní peptid - MHC do cytoplasmy T-lymfocyту [73]. Sekvence jednotlivých řetězců komplexu CD3 je shodná pro všechny klony T-lymfocytů [71].

Na základě rozpoznání komplexu antigenního peptidu s MHC pomocí TCR vzniká v místě kontaktu T-lymfocyту s antigen prezentující buňkou komplexní struktura zvaná imunologická synapse [74]. Ke vzniku této struktury je mimo jiné nutná změna poměrů v lipidových raftech a jejich interakce s TCR [75] a také přestavba aktinového cytoskeletu T-lymfocyту, která je iniciovaná interakcí cytoplasmatické části řetězce CD3ε s adaptorovým proteinem Nck [76].

V literatuře lze nalézt různé modely stechiometrie komplexu TCR - CD3. Jeden z modelů předpokládá, že při utváření TCR během zrání T-lymfocytů pravděpodobně vznikají nejprve nekovalentní trimery TCRβ - CD3εγ a TCRα - CD3εδ, které následně asociují za tvorby funkčního komplexu TCR - CD3, který je stabilisován disulfidovou vazbou mezi řetězci TCRα a TCRβ [77-80]. Homodimer CD3ζζ s tímto komplexem asociuje v transmembránové oblasti řetězce TCRα [77]. Alternativní model stechiometrie komplexu TCR - CD3 je založen na předpokladu asociace CD3εγ a CD3εδ zároveň s oběma řetězci TCRα i TCRβ za vzniku tetramerů CD3εγ - TCRαβ a CD3εδ - TCRαβ. Asociací tetramerů přes homodimer CD3ζζ vzniká komplex TCR - CD3 - TCR [81-83]. Moderní pohled na stechiometrii komplexu TCR - CD3 je však takový, že na jednom nestimulovaném T-lymfocyту existují monovalentní komplexy (složené z jednoho dimeru TCRαβ a dimerů CD3εγ, CD3εδ a CD3ζζ) a zároveň shluky polyvalentních komplexů různé stechiometrie [84].

Intracelulární signalisace zprostředkovaná komplexem CD3 probíhá dvěma hlavními mechanismy. Prvním mechanismem je fosforylační aktivace fosfolipasy C [85], která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát za tvorby takzvaných druhých posílů. Těmi jsou inositol-1,4,5-trisfosfát, který ovlivňuje intracelulární hladinu vápenatých iontů, a diacylglycerol, který dále aktivuje protein kinasu C [86, 87]. Druhým mechanismem je aktivace protein tyrosin kinas. Cytoplasmatické domény řetězců komplexu CD3 obsahují ve svých sekvencích takzvané tyrosinové aktivační motivy receptorů imunoglobulinové rodiny (ITAM, z angl. immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motif). Signalisace cestou aktivace protein tyrosin kinas začíná aktivací kinas rodiny src, které následně fosforylují motivy ITAM, na kterých tímto vznikají vazebná místa pro protein tyrosin kinasu ZAP-70, která je po vazbě na motivy ITAM fosforylačně aktivována a následně fosforyluje mnoho dalších substrátů. Dochází však také k její autofosforylaci,

čímž se ZAP-70 stává zároveň adaptorovým proteinem a zapojuje tak do signalizační kaskády další efektorové proteiny [87, 88].

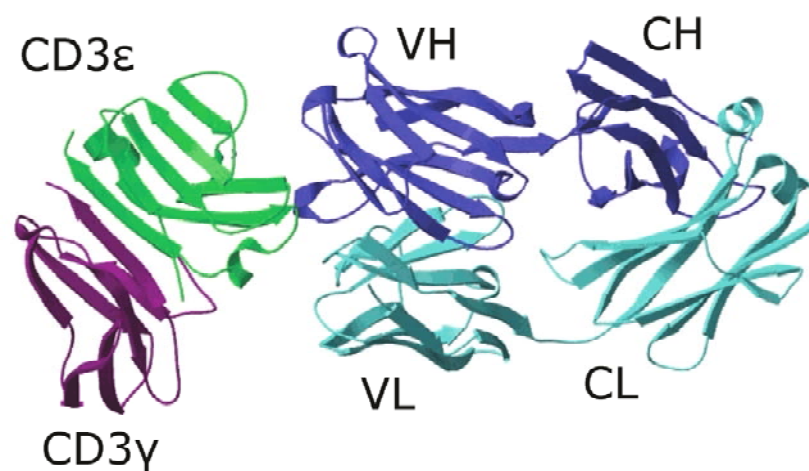
Signalizační cesty vedou postupně k aktivaci transkripčních faktorů, což má za následek T-buněčnou imunitní odpověď na interakci s antigenem například v podobě pozitivní či negativní selekce thymocytů, ovlivnění buněčné cytotoxicity regulací expresní hladiny perforinů a granzymů, regulace sekrece různých typů cytokinů nebo ovlivnění míry adheze T-buněk regulací exprese integrinů a jiných typů adhezních molekul [87].

2.2.2 Protilátka MEM-57

Monoklonální protilátka MEM-57 je myší imunoglobulin podtřídy IgG2a s lehkými řetězci typu kappa, produkováný myší hybridomovou linií MEM-57, která byla sestrojena na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. Tato protilátka specificky rozpoznává komplex CD3 na povrchu lidských T-lymfocytů [3].

Většina protilátek proti komplexu CD3 rozpoznává epitopy v rámci řetězce CD3 ϵ [89]. Jejich epitopy mají strukturní charakter a jsou přítomny pouze v případě, že je řetězec CD3 ϵ v kontaktu s řetězcem CD3 γ nebo CD3 δ [90]. Tento typ strukturního epitopu má i protilátka MEM-57 [91] a také první monoklonální protilátka proti CD3, nazvaná OKT3 [92]. Vazba protilátky MEM-57 na CD3 blokuje vazbu protilátky OKT3 [93], epitop protilátky MEM-57 se tedy nejspíše překrývá s epitopem protilátky OKT3, což bylo pozorováno i u dalších protilátek proti CD3 [90]. Protilátka OKT3 totiž rozpoznává obzvláště malou oblast řetězce CD3 ϵ , jak je patrné z krystalové struktury komplexu extracelulárních domén heterodimeru CD3 $\epsilon\gamma$ s fragmentem Fab protilátky OKT3, uvedené na obrázku 6 (str. 24) [94].

Protilátka OKT3 je první myší monoklonální protilátkou, schválenou pro terapeutické použití jako imunosupresivum při transplantacích pod názvem muromonab CD3 (Orthoclone OKT3) [95-97]. Protilátka MEM-57 vykazuje podobné vlastnosti jako terapeutická protilátka OKT3, a proto by mohla být využita v klinické diagnostice autoimunitních onemocnění, pro klasifikaci T-buněčných leukemií a případně také jako imunosupresivum v terapii odhojovacích krizí při transplantacích [3]. Nejmodernější terapeutické využití protilátky MEM-57 by však spočívalo ve využití jejího fragmentu scFv pro konstrukci protilátkového fragmentu formátu BiTE [62].



Obrázek 6: Krystalová struktura heterodimeru extracelulárních domén CD3 $\epsilon\gamma$ v komplexu s fragmentem Fab protilátky OKT3
Modře jsou zobrazeny variabilní (VH) a konstantní (CH) domény těžkého řetězce protilátky, tyrkysově variabilní (VL) a konstantní (CL) domény lehkého řetězce protilátky. Zeleně je zobrazen řetězec CD3 ϵ a fialově řetězec CD3 γ . Šipky representují strukturu skládaného listu.
Upraveno podle [94].

3 Cíl práce

Tato práce je součástí dlouhodobého projektu řešeného ve školící laboratoři, který je zaměřen na studium monoklonálních protilátek a jejich rekombinantních fragmentů, které by mohly být využitelné při terapii a diagnostice nádorových onemocnění a virových infekcí.

Cíle diplomové práce:

- literární přehled problematiky rekombinantních fragmentů monoklonálních protilátek s důrazem na jejich terapeutické a diagnostické využití, shrnutí informací o receptoru T-buněk, znaku CD3 a protilátce MEM-57, dostupných v literatuře
- heterologní exprese, izolace a purifikace protilátkového fragmentu scFv MEM-57
- charakterizace antigen vazebné aktivity připraveného protilátkového fragmentu scFv MEM-57
- prekrystalizační charakterizace biofysikálních vlastností protilátkového fragmentu scFv MEM-57
- krystalizace protilátkového fragmentu scFv MEM-57 pro rentgenostrukturní analýzu

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Bakteriální kmeny a buněčné kultury

Escherichia coli BL21 (DE3)

E. coli s DE3 profágem λ , nesoucím gen T7 RNA polymerasy pod transkripční kontrolou promotoru p_{lacUV5} (Novagen, USA)

Jurkat

Buněčná linie odvozená od buněk lidské akutní leukemie T-buněk [98]

Ramos

Buněčná linie odvozená od lidských B-buněk Burkittova lymfomu [98]

4.1.2 Plasmidy a kultivační média

Expresní plasmidy

Plasmidy pscFvMEM-57 odvozené od pET22b(+) (Novagen, USA) byly zkonstruovány ve školicí laboratoři.

LB (Luria-Bertani) médium

Složení: 10 mg/ml Bacto Trypton (Difco, USA); 5 mg/ml Yeast Extract (Difco, USA); 5 mg/ml chlorid sodný; 0,1 mg/ml ampicilin; pH 7,4 (nastaveno Tris basí)

LB agar

Složení: 15 mg/ml agar (Difco, USA); 0,1 mg/ml ampicilin; 1% (w/v) glukosa

IMDM médium (PAA Laboratories, Rakousko)

Médium pro pěstování tkáňových kultur odvozených od lidských lymfocytů, kompletní směs potřebných živin (glukosa, aminokyseliny, vitaminy a ionty)

4.1.3 Protilátky

anti-c-myc/hPx; klon 9E10 (Roche, Švýcarsko)

Myší monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou rozpoznává c-myc epitop, který je součástí konstruktů scFv MEM-57.

anti-c-myc/FITC; klon 9E10 (Exbio Praha, Česká republika)

Myší monoklonální protilátka konjugovaná s FITC rozpoznává c-myc epitop, který je součástí konstruktů scFv MEM-57.

IgG MEM-57 (Exbio Praha, Česká republika)

Myší monoklonální protilátka MEM-57

GAM/FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)

Kozí polyklonální protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s FITC

4.1.4 Chemikálie

agarosa	Bio-Rad, USA
akrylamid	Fluka, Švýcarsko
ampicilin	Biotika, Slovenská republika
Bicin	Sigma-Aldrich, USA
bromfenolová modř	Lachema, Česká republika
citrát sodný	Lachema, Česká republika
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
diethanolamin	Fluka, Švýcarsko
dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, Česká republika
dihydrogenfosforečnan sodný	Lachema, Česká republika
dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich, USA
dusičnan stříbrný	Sigma-Aldrich, USA
ethanol	Penta, Česká republika
ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)	Lachema, Česká republika
ethylglukuroid (ETG)	laskavě poskytl Jan Ježek, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.
fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche, Švýcarsko
formaldehyd	Lachema, Česká republika
glukosa	Penta, Česká republika
glycerol	Penta, Česká republika
glycin	Sigma-Aldrich, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, USA
hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, USA
hydrogenfosforečnan sodný	Merck, Německo
hydroxid sodný	Lachema, Česká republika
chlorid draselný	Lachema, Česká republika
chlorid sodný	Lachema, Česká republika
imidazol	Fluka, Švýcarsko

kyselina chlorovodíková	Lachema, Česká republika
kyselina octová	Lachema, Česká republika
MES	Sigma-Aldrich, USA
methanol	Penta, Česká republika
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, USA
N,N'-methylen-bis(akrylamid) (BIS)	Fluka, Švýcarsko
octan amonný	Lachema, Česká republika
octan sodný	Lachema, Česká republika
odtučněné mléko	Eligo, Česká republika
persíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
polyethylenglykol (PEG) 3350	Sigma-Aldrich, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, USA
propidium jodid	Sigma-Aldrich, USA
sacharosa	Serva, Německo
síran hořečnatý	Lachema, Česká republika
thiosíran sodný	Lachema, Česká republika
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, USA
uhličitan sodný	Penta, Česká republika

Často používané pufrý:

PBS

10mM hydrogenfosforečnan sodný; 1,8mM dihydrogenfosforečnan draselný;

136mM chlorid sodný; 2,6mM chlorid draselný; pH 7,2

4.1.5 Ostatní materiál

- chromatografické kolony MonoQ 10/100 GL Tricorn (Amersham Biosciences, Velká Británie) a Superdex 200 10/300 GL Tricorn (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- chromatografický nosič Ni-CAM HC Resin (Sigma-Aldrich, USA)
- centrifugační filtry Microcon a Amicon Ultra (Millipore, USA)
- celulosová dialyzační membrána, mezní velikost pórů 10 000 Da (Sigma-Aldrich, USA)
- přírodní celofán na sušení gelů po SDS-PAGE (Pemar, Česká republika)
- nitrocelulosová membrána pro WB přenos bílkovin Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Velká Británie)

- filtrační papír pro WB přenos bílkovin (Sigma-Aldrich, USA)
- jednorázové filtry Puradisc TM 25PP, póry 0,2 µm (Whatman, Velká Británie)
- standard molekulových hmotností pro SDS-PAGE Broad range (Bio-Rad, USA)
- standard molekulových hmotností pro gelovou chromatografii (Sigma-Aldrich, USA)
- substrát křenové peroxidasy 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB; Sigma-Aldrich, USA)
- polypropylenová mikrotitrační destička s kulatým dnem na FACS (Sigma Aldrich, USA)
- fluorescenční barvivo SYPRO® Orange (Invitrogen, USA)
- destička na real-time PCR LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (Roche, Švýcarsko)
- fólie na destičku na real-time PCR LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche, Švýcarsko)
- destičky na krystalizaci Intelli-plate (Art Robbins Instruments, USA) a EasyXtal Tool (Qiagen, USA)
- fólie na krystalizační destičky Greiner VIEWseal (Jena Bioscience, Německo)
- kapiláry na krystalizaci Borokapillaren (GLAS, Německo)
- sada 96 precipitačních roztoků na krystalizaci PEGs Suite (Qiagen, USA)
- sada aditiv pro krystalizaci Additive Screen® (Hampton Research, USA)
- olej pro krystalizaci Al's Oil (Hampton Research, USA)

4.2 Přístroje a vybavení

centrifugy

Hettich Zentrifugen EBA 12R, rotor 1412, Německo
 Eppendorf Mini Spin, Německo
 Hermle Z 323 K, Německo
 Sorvall Instruments RC-3B, rotor H 4000, USA
 Heraeus Multifuge 3S-R Thermo Electron Corporation, Německo
 Beckman J-21M, rotor JA-14, JA-21, USA
 Thermo Scientific IEC CL10, USA

spektrofotometry	Ultrospec 3100 <i>pro</i> UV/Visible Spectrophotometer Amersham Biosciences, Velká Británie NanoDrop ND-1000, USA Laser-Spectroscatter 201 RiNA GmbH Netzwerk RNA-Technologien, Německo
souprava na elektroforesu	Mighty Small II SE 250 Hoefer Scientific Instruments, USA; zdroj Consort EV243, Belgie
souprava na WB přenos	The W.E.P. Company, USA; zdroj Consort EV243, Belgie
rotační inkubátory	Gallenkamp (37 °C), Velká Británie Sanyo Orbital Incubator (20 °C), Japonsko
FPLC	Äkta Basic Amersham Bioscience, Švédsko
fázově kontrastní mikroskop	Carl Zeiss Jena, Německo
optické mikroskopy	Nikon TMS, Japonsko Olympus SZX10, Japonsko Nikon SMZ660, Japonsko
fotoaparáty	Olympus E-620, Japonsko Nikon Coolpix P6000, Japonsko
robotický digitální mikroskop	CrysCam Digital Microscope Art Robbins Instruments, USA
průtokový cytometr	BD FACS Aria, USA
laminární box	BSB 4A Gelaire, Austrálie
termostaty	TCH 100 Laboratorní přístroje Praha, Česká republika Sanyo CO ₂ incubator MCO-ATAI, Japonsko
váhy	Kern PRS 620-3, Německo Ohaus Adventurer Pro AV2102CM, USA
pH metr	GMH 3530 Griesinger Electronic, Německo
sonikátor	Soniprep 150 MSE, Velká Británie
konduktometr	GMH 3430 Griesinger Electronic, Německo
třepačka	Rotamax 120 Heidolph Instruments, Německo
magnetická míchačka	Jenway 1000, Velká Británie
real-time PCR	Roche LightCycler [®] 480 II, Švýcarsko
krystalizační robot	Crystal Gryphon Art Robbins Instruments, USA

4.3 Experimentální metody

4.3.1 Expres a izolace rekombinantních fragmentů protilátek

4.3.1.1 Rekombinantní expres

Protilátkové fragmenty byly exprimovány rekombinantně v hostitelských bakteriích *E. coli* BL21 (DE3) čerstvě transformovaných odpovídajícím plasmidem metodou teplotního šoku. Při transformaci bylo smícháno 100 µl suspence kompetentních buněk *E. coli* (OD_{550nm} kolem 0,2) s 1 µl (cca 50 - 100 ng) plasmidu pscFvMEM-57. Tento plasmid byl odvozen od pET22b(+) a pod kontrolou promotoru fága T7 obsahuje kromě sekvence rekombinantního fragmentu geny pro represor lacI^q a β-laktamasu. Vzniklá směs byla poté vystavena teplotnímu šoku při postupné inkubaci 30 min. na ledu, 45 s ve vodní lázni při 42 °C a 2 min. na ledu. Takto ošetřenou bakteriální suspensí bylo zaočkováno 900 µl LB média bez ampicilinu a třepáno (150 ot./min.) 1 hod. při 37 °C v inkubátoru TCH 100. Pak byla suspence rozetřena po 300 µl na LB agarové plotny (průměr 20 cm, 150 ml agaru) obsahující ampicilin (0,1 mg/ml) a 1% (w/v) glukosu a plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

Narostlé kolonie byly smyty z každé plotny 10 ml LB média s ampicilem (0,1 mg/ml) a 0,4 % (v/v) glycerolem. Na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* byla změřena OD_{550nm} vzniklé buněčné suspence, kterou bylo následně zaočkováno vždy 500 µl LB média s glycerolem a ampicilem ve 2 l Erlenmeyerových baňkách tak, aby výsledná hodnota OD_{550nm} byla kolem 0,1.

Bakteriální kultury byly inkubovány v rotačním inkubátoru Gallenkamp při 37 °C a 200 ot./min. a jejich růst byl každou hodinu sledován měřením OD_{550nm} na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro*. Po dosažení hodnoty OD_{550nm} kolem 1,0 byly baňky přeneseny do předem vychlazeného rotačního inkubátoru Sanyo a dále temperovány při 200 ot./min. Při dosažení požadované teploty 20 °C byla provedena indukce exprese přidavkem ETG do finální koncentrace 0,25 mmol/l. Bakteriální kultury byly dále pěstovány za stejných podmínek (20 °C, 200 ot./min.) dalších 3 - 5 hod. (podle rychlosti růstu sledované měřením OD_{550nm}).

Ukládání rekombinantního proteinu do inklusních tělísek bylo pozorováno v optickém fázově kontrastním mikroskopu (Carl Zeiss; pozorovány černé konce nekontrastních buněk).

4.3.1.2 Isolace

Biomasa byla izolována centrifugací (5 000 ot./min., 30 min., 4 °C; Sorvall Instruments RC-3B, rotor H 4000). Pelety byly suspendovány na ledu ve vychlazeném hypertonicném „omývacím“ pufru (30% w/v sacharosa; 50mM Tris pH 8,0; 1mM EDTA; 1mM PMSF), přibližně 10 ml pufru na 1 g biomasy. Suspense byla třepána na ledu 5 min. při 150 ot./min. a následně centrifugována při 12 000 ot./min., 20 min., 4 °C (centrifuga Beckman, rotor JA-14). Supernatant byl uložen při 4 °C pro další zpracování. Peleta byla suspendována na ledu ve vychlazeném hypotonickém „šokovém“ pufru (5mM síran hořečnatý; 10mM Tris pH 8,0; 1mM PMSF), přibližně 20 ml pufru na 1 g biomasy. Suspense byla třepána na ledu (45 min., 150 ot./min.) a opět centrifugována (12 000 ot./min., 40 min., 4 °C; Beckman, JA-14). Peleta obsahující sferoblast a případné periplasmatické inkluze byla zmrazena a supernatant uložen při 4 °C pro další zpracování. Uvedený postup exprese a izolace vychází z prací [31, 32, 99].

Následovala dialýza spojených isolačních supernatantů proti pufru vhodnému pro chelatační chromatografii (50mM dihydrogenfosforečnan sodný pH 8,3; 300mM chlorid sodný).

4.3.2 Stanovení koncentrace proteinu měřením absorbance

Absorbance roztoků proteinů byla měřena při vlnové délce 280 nm [100] při pokojové teplotě v 1 cm křemenných kyvetách na přístroji Ultrospec 3100*pro* nebo, v případě malých objemů koncentrovaných vzorků, na přístroji NanoDrop ND-1000. Hodnoty absorpčních koeficientů při 280 nm pro výpočet koncentrací fragmentů scFv MEM-57 jsou:

1,644 ml·mg⁻¹·cm⁻¹ pro variantu H9Ala-H11Leu

a 1,646 ml·mg⁻¹·cm⁻¹ pro variantu H9Gly-H11Pro.

Tyto hodnoty byly teoreticky vypočítány programem ExPASy - ProtParam Tool [101].

4.3.3 Dialýza a ultrafiltrace

Proteinové roztoky byly dialyzovány proti vhodnému pufru při teplotě 4 °C obvykle přes noc za stálého míchání dialyzátu, případně byl dialyzát několikrát vyměněn za čerstvý pufr (především při dialýze izolovaných periplasmatických proteinů). Byla použita

dialyzační membrána s mezní velikostí pórů 10 000 Da pro globulární proteiny. Případné agregáty byly po dialýze odstraněny centrifugací (12 000 ot./min., 30 min., 4 °C; centrifuga Beckman, rotor JA-14, nebo 12 000 ot./min., 20 min., 4 °C; centrifuga Hermle Z 323 K).

Proteinové roztoky byly zahušťovány ultrafiltrací pomocí centrifugačních filtrů s membránou o mezní velikosti pórů 10 000 Da pro globulární proteiny (Millipore). Větší objemy roztoků byly zahušťovány na filtrech Amicon Ultra (7 000 g, 4 °C; centrifuga Hermle Z 323 K), menší objemy na filtrech Microcon (11 000 ot./min., 4 °C; centrifuga Hettich EBA 12 R) [102].

4.3.4 Chromatografické metody

4.3.4.1 Chelatační chromatografie

Konstrukty scFv byly na C-konci opatřeny His₅-kotvou, pro nabohacení vzorku rekombinantním fragmentem scFv byla proto použita chelatační chromatografie na koloně Ni-CAM (Ni-agarosa) HC Resin. Výhodou bylo současné zahuštění vzorku [103]. Chromatografie byla provedena v chladové místnosti při teplotě 4 °C. Kolona (10 mm x 60 mm) byla ekvilibrována ve filtrovaném pufru A (50mM dihydrogenfosforečnan sodný pH 8,3; 300mM chlorid sodný), ve kterém byl na kolonu následně nanesen vzorek (po dialýze a centrifugaci) při průtoku cca 1,5 ml/min. Kolona byla poté promyta puftrem A a následně puftrem A s přídavkem 5mM imidazolu pro odstranění nespecificky vázaných makromolekulárních příměsí. Eluce byla provedena puftrem A s přídavkem 50mM a následně 200mM imidazolu. Objem jímaných frakcí odpovídal objemu chromatografického nosiče, standardně se pohyboval kolem 6 ml. Z důvodu absorpce imidazolu při 280 nm byly eluované frakce analyzovány pouze pomocí SDS-PAGE.

Následovalo převedení spojených frakcí obsahujících rekombinantní protein pomocí dialýzy do pufru vhodného pro ionexovou chromatografii (20mM diethanolamin pH 8,4).

4.3.4.2 Ionexová chromatografie

Druhým purifikačním krokem byla ionexová chromatografie [104] na koloně MonoQ 10/100 GL Tricorn o objemu 8 ml (silný aniont, aktivní skupinou je kvarterní amin)

na FPLC aparatuře Äkta Basic. Nejprve bylo ověřeno, že vodivost vzorku odpovídá vodivosti filtrovaného a odvzdušněného pufru A (20mM diethanolamin pH 8,4), ve kterém byl vzorek nanášen na předem ekvilibrovanou kolonu. Po krátkém promytí kolony pufrům A byla provedena eluce segmentovaným gradientem chloridu sodného v pufru A podle následujícího schématu:

0 – 0,2M NaCl: 0 – 160 ml

0,2 – 1M NaCl: 160 – 240 ml

1M NaCl: 240 – 280 ml

1 – 0M NaCl: 280 – 320 ml

Průtok byl dle doporučení výrobce 4 ml/min., tlak maximálně 4 MPa. Eluční profil byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Průběh purifikace byl dále analyzován pomocí SDS-PAGE.

4.3.4.3 Gelová permeační chromatografie

Pro zjištění přítomnosti multimerních forem scFv v jednotlivých frakcích z ionexové chromatografie byla provedena analytická gelová chromatografie [104] na koloně vhodné k dělení globulárních proteinů o molekulové hmotnosti 10 - 600 kDa (Superdex 200 10/300 GL Tricorn o objemu 23 ml) na FPLC aparatuře Äkta Basic. Jako mobilní fáze byl použit filtrovaný a odvzdušněný 20mM diethanolamin pH 8,4; 100mM chlorid sodný. Průtok byl dle doporučení výrobce 0,5 ml/min., tlak maximálně 1,5 MPa. Eluční profil byl sledován spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm.

Kolona byla podle pokynů výrobce kalibrována standardem molekulových hmotností, obsahujícím proteiny: aprotinin (6,5 kDa), cytochrom C (12,4 kDa), karbonická anhydrasa (29 kDa), hovězí sérový albumin (66 kDa) a dextran blue (2 MDa). Jako mobilní fáze byl pro kalibraci použit filtrovaný a odvzdušněný 50mM Tris pH 7,5; 100mM chlorid sodný.

4.3.5 Elektromigrační metody

4.3.5.1 SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) [105] byla prováděna podle Laemmliho [106] na aparatuře Mighty Small II

SE 250. Rozměry deskových gelů byly 80 x 70 x 0,75 mm. Dělicí gel obsahoval 15% (w/v) AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:29; 375mM Tris pH 8,8; 1mM EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný pro iniciaci polymerace. Zaostřovací gel obsahoval 5% (w/v) AA a BIS ve stejném poměru jako dělicí gel; 125mM Tris pH 6,8; 1mM EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný. Elektrodový pufr obsahoval 20mM Tris pH 8,3; 200mM glycín a 0,1% (w/v) SDS.

Vzorky proteinu byly před nanesením na zaostřovací gel smíchány v poměru 2:1 se vzorkovým pufrem (125mM Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) bromfenolová modř), povařeny 5 min. ve vodní lázni a krátce centrifugovány (13 400 ot./min., 30 s, lab. teplota; centrifuga Eppendorf MiniSpin). Vzorky buněčných pelet byly předem krátce sonikovány (sonikátor Soniprep 150 MSE). Elektroforesa byla prováděna za laboratorní teploty při výkonu 1,5 W na zaostřovací gel a 3 W na dělicí gel. Jako standard molekulových hmotností byla používána směs proteinů Broad Range, obsahující myosin (200 kDa), β -galaktosidasu (116,3 kDa), fosforylasu b (97,4 kDa), sérový albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonickou anhydrazu (31 kDa), trypsinový inhibitor (21,5 kDa), lysozym (14,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa).

Barvení Coomassie Brilliant Blue

V případě vyšší koncentrace proteinů v gelu po SDS-PAGE byly proteiny vizualizovány ponořením gelu na 20 min. do 0,05% (w/v) roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 45% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové a následným odbarvením v roztoku 25% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyseliny octové [107, 108].

Barvení stříbrem

Proteiny o nižší koncentraci byly na SDS-PAGE gelu vizualizovány stříbrem pro větší citlivost. Nejprve byla provedena fixace proteinů v gelu 1 hod. roztokem 12% (v/v) kyseliny octové, 50% (v/v) methanolu a 0,05% (v/v) formaldehydu. Následně byl gel třikrát 10 min. omýván 50% (v/v) methanolem, poté byl 1 min. omýván 0,8mM roztokem thiosíranu sodného a následně opláchnut destilovanou vodou třikrát po dobu asi 20 s. Po 20 min. inkubace s 12mM roztokem dusičnanu stříbrného a 0,075% (v/v) formaldehydem byl gel několikrát důkladně opláchnut destilovanou vodou a „vyvoláván“ v 570mM roztoku uhličitanu sodného s 0,05% (v/v) formaldehydem a 16 μ M thiosíranem

sodným až do vybarvení gelu, proces byl zastaven roztokem 12% (v/v) kyseliny octové a 50% (v/v) methanolu. Nakonec byl gel omyt a uchován v 50% (v/v) methanolu, aby nedošlo k odbarvení [109].

Sušení gelů

Pro dokumentační účely byly gely spolu s přírodním celofánem 20 min. máčeny v sušicím roztoku 20% (v/v) ethanolu a 3% (v/v) glycerolu [110] a sušeny v celofánu napnutém v sušicím rámečku.

4.3.5.2 Western blot s imunodetekcí

K ověření identity fragmentů scFv byla použita metoda příčného elektroforetického přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu (z angl. western blotting, dále WB přenos) [111] s následnou detekcí proteinů protilátkami. Postup vycházel z práce [112]. K detekci fragmentů bylo využito přítomnosti c-myc epitopu [113] v konstruktu scFv MEM-57.

WB přenos proteinů byl prováděn na aparatuře firmy The W.E.P. Company za laboratorní teploty. Gel, membrána Hybond-C Extra a blotovací papíry byly ekvilibrovány 5 min. v elektrodovém pufru, který obsahoval 20mM Tris pH 8,3; 200mM glycin; 0,1% (w/v) SDS a 20% (v/v) methanol. Na 1 cm² membrány byl aplikován konstantní elektrický proud o velikosti 1 mA po dobu 1,5 hod. Účinnost přenosu byla kontrolována reversibilním barvením membrány 0,1% (w/v) Ponceau S v 5% (v/v) kyselině octové (odbarveno za třepání puforem PBS), poté byl povrch membrány zablokován 5% (w/v) roztokem odtučněného mléka v PBS přes noc při 4 °C. Po krátkém omytí puforem PBS byla membrána inkubována 1 hod. při 37 °C za mírného třepání s monoklonální protilátkou proti c-myc epitopu konjugovanou s křenovou peroxidasou (anti-c-myc/hPx) o koncentraci 1 µg/ml v 5% (w/v) roztoku mléka v PBS. Proteiny specificky rozpoznávané touto protilátkou byly po krátkém omytí membrány puforem PBS vizualizovány přidávkem chromogenního substrátu křenové peroxidasy (TMB).

4.3.6 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie byla použita k ověření afinity připraveného rekombinantního fragmentu scFv MEM-57 k antigenu CD3 na povrchu buněk Jurkat [114].

Buňky linie Jurkat a Ramos (negativní kontrola) byly pěstovány v médiu IMDM při 37 °C v atmosféře 5% oxidu uhličitého (inkubátor Sanyo CO₂ incubator MCO-ATAI) a pasážovány standardním způsobem [115]. Buňky byly sklizeny centrifugací (300 g, 5 min., 4 °C; centrifuga Heraeus Multifuge 3S-R, výkyvný rotor). Po odstranění supernatantu byla peleta omyta vychlazeným pufrům PBS a po centrifugaci za stejných podmínek a odstranění supernatantu suspendována ve vychlazeném 1% (w/v) BSA v PBS. Na každou jamku 96-jamkové polypropylenové mikrotitrační destičky s kulatým dnem na FACS bylo nanášeno přibližně $2 \cdot 10^5$ buněk v 10 µl suspence a 10 µl primární protilátky (testované fragmenty scFv o koncentraci 0,5 – 2,5 mg/ml a mateřský imunoglobulin MEM-57 o koncentraci 2,5 µg/ml jako pozitivní kontrola) ředěné do vychlazeného 1% (w/v) BSA v PBS. Destička byla krátce protřepána a inkubována 20 min. na ledu. Následně byl přidán vychlazený 1% (w/v) BSA v PBS a po centrifugaci za stejných podmínek, odstranění supernatantu a po opětovném omytí buněk vychlazeným 1% (w/v) BSA v PBS byla destička inkubována se sekundárními protilátkami (anti-c-myc/FITC o koncentraci 2,5 µg/ml pro testované fragmenty scFv a polyklonální GAM/FITC o koncentraci 3,8 µg/ml pro mateřský imunoglobulin MEM-57). Inkubace probíhala bez přístupu světla, protože sekundární protilátky nesly fluorescenční značku FITC (fluorescein-5-isothiokyanát) [116]. Buňky na destičce byly po inkubaci opět omyty stejným způsobem 1% (w/v) BSA v PBS a následně byly z destičky uvolněny suspendováním ve 200 µl vychlazeného PBS s propidium jodidem o výsledné koncentraci 0,5 - 1 µg/ml. Vzniklá buněčná suspence byla přenesena do zkumavek určených k měření na přístroji BD FACS Aria (Ing. J. Günterová, ÚOCHB AV ČR, v.v.i.). K analýze a přípravě obrázků byl použit program FlowJo 7.2.5 (Tree Star, USA).

4.3.7 Diferenční skenovací fluorimetrie

Metoda diferenční skenovací fluorimetrie byla využita k nalezení vhodného pufru, stabilizujícího scFv MEM-57 a potlačujícího jeho oligomerizaci. Postup vycházel z práce Ericsson *et al.*, 2006 [117].

V jamce 96-jamkové mikrotitrační destičky pro real-time PCR (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96) byla připravena směs o celkovém objemu 25 µl, obsahující příslušný 100mM pufr (případně také 200mM chlorid sodný), scFv MEM-57 o koncentraci 0,1 mg/ml a fluorescenční barvivo SYPRO® Orange (1 000x ředěné H₂O). Testované pufrы

jsou uvedeny v tabulce 1, vždy byla testována varianta pufru bez soli a varianta s přídavkem 200mM chloridu sodného. Dále byla testována také destilovaná voda bez a s přídavkem 200mM chloridu sodného a také původní pufr, ve kterém byl protein skladován po ionexové chromatografii (20mM diethanolamin pH 8,4; 50mM chlorid sodný). Destička s testovanými podmínkami byla zakryta fólií LightCycler® 480 Sealing Foil a podrobena teplotnímu gradientu (20 °C - 95 °C během 90 min.) na přístroji real-time PCR Roche LightCycler® 480 II, během gradientu byla snímána fluorescence barviva SYPRO® Orange v rozmezí vlnových délek 465 - 580 nm. Data byla vyhodnocena pomocí software Roche LightCycler® 480 SW 1.5 k real-time PCR.

Tabulka 1: Diferenční skenovací fluorimetrie
Testované 100mM pufrы o různých hodnotách pH

100mM pufr	pH		
octan sodný	4,5	5,0	
citrát sodný	4,7		
dihydrogenfosforečnan draselný	5,0	6,0	7,0
dihydrogenfosforečnan sodný	5,5	6,5	7,5
MES	5,8	6,2	6,5
HEPES	7,0	8,0	
octan amonný	7,3		
Tris	7,5	8,0	8,5
imidazol	8,0		
Bicin	8,0	9,0	

4.3.8 Dynamický rozptyl světla

Měření dynamického rozptylu světla na koncentrovaných roztocích scFv MEM-57 bylo prováděno těsně před krystalizací pro získání informací o stupni dispersity vzorků, tedy o případné přítomnosti oligomerních a agregovaných forem scFv [118, 119].

Dynamický rozptyl světla byl měřen na 15 µl vzorku ihned po zahuštění a usazení případných agregátů a prachových částic centrifugací (12 800 ot./min., 20 min., 4 °C; centrifuga Hettich EBA 12R) ve speciální kyvetě na přístroji Laser-Spectroscatter 201 při vlnové délce 532 nm pod úhlem 90° při teplotě 20 °C.

4.3.9 Krystalizace difusí par

Pro krystalizaci scFv MEM-57 byla použita metoda difuze par [120] v provedení sedící nebo visící kapky. Veškeré krystalizační pokusy probíhaly při teplotě 18 °C. Průběh krystalizace byl sledován pomocí optických mikroskopů Nikon SMZ660 a Olympus SZX10, krystalizační kapky byly fotografovány pomocí robotického digitálního mikroskopu CrysCam Digital Microscope (software CrysScore) nebo fotoaparátů Nikon Coolpix P6000 a Olympus E-620 (software QuickPHOTO CAMERA 2.3).

4.3.9.1 Metoda sedící kapky

K nalezení vhodných výchozích podmínek pro krystalizaci scFv MEM-57 byla použita metoda sedící kapky [121]. Kapky o objemu 450 nl byly nasazeny na 3x96-jamkovou destičku Intelli-plate za pomoci krystalizačního robota Crystal Gryphon, destička byla překryta fólií Greiner VIEWseal. Roztok proteinu byl v kapkách smíchán s precipitačním roztokem v poměru 2:1 a 1:2, objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 50 µl. Jako precipitační roztok byla použita komerční sada 96 precipitačních roztoků PEGs Suite, obsahující jako precipitant polyethylenglykol různé molekulové hmotnosti v různých pufrech a s přidavkem různých anorganických i organických solí. Koncentrace proteinu a složení výchozího pufru se lišily u jednotlivých variant a frakcí (viz část 5.4 Krystalizace scFv MEM-57, str. 56).

Sedící kapky o objemu 1 µl nebo 3 µl byly nasazovány ručně na 2x96-jamkovou destičku Intelli-plate, destička byla překryta fólií Greiner VIEWseal. Roztok proteinu byl v kapkách smíchán s precipitačním roztokem v poměru 1:1 nebo 2:1, objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 50 µl. Jako precipitační roztoky byly použity vybrané podmínky z komerční sady PEGs Suite.

4.3.9.2 Metoda visící kapky

Metoda visící kapky [120] byla používána k optimalizaci krystalizace scFv MEM-57. Kapky byly nasazovány ručně na 24-jamkové destičky EasyXtal Tool. Objem kapek se pohyboval od 1,5 µl do 3,3 µl, roztok proteinu byl v kapkách smíchán s precipitačním roztokem v poměru 1:1 nebo 2:1, objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 500 µl.

Jako precipitační roztok byly použity vybrané roztoky z komerční sady PEGs Suite, tyto roztoky byly pro některé krystalizační pokusy různým způsobem upraveny.

V některých případech byly do krystalizačních kapek přidávány roztoky aditiv z komerční sady Additive Screen[®], do kapky o objemu 3 μ l bylo přidáno 300 nl roztoku aditiva.

Precipitační roztok v rezervoáru byl při některých pokusech pro zpomalení difuze par [122] převrstven 100 μ l směsí silikonového a parafinového oleje 1:1 (Al's Oil) [123].

Očkování krystalů

Dalším optimalizačním krokem bylo vnášení krystalizačních jader očkováním kočičím vousem [124]. Nejprve byla vousem zachycena krystalizační jádra z povrchu již utvořených krystalů, nevhodných pro rentgenostrukturní analýzu. Poté byl vous lehce omyt v kapce precipitačního roztoku a následně byl vous protažen postupně třemi krystalizačními kapkami, ve kterých byla koncentrace proteinu nižší, než v kapce, ze které byla získána jádra.

Metoda „heat-cut“

Pro přednostní denaturaci případně špatně sbalené frakce molekul scFv MEM-57 před krystalizací byla použita metoda „heat-cut“ [125]. 2 μ l proteinu byly inkubovány 5 min. při 52 °C a vzniklý precipitát byl ihned usazen centrifugací (12 800 ot./min., 20 min., 4 °C; centrifuga Hettich EBA 12 R).

Odstranění krystalizačních jader centrifugací

Pro snížení počtu krystalizačních jader v kapce bylo smícháno 7 μ l roztoku proteinu se 7 μ l precipitačního roztoku (PEGs Suite). Tato směs byla stáčena (12 800 ot./min., 20 min., 4 °C; centrifuga Hettich EBA 12 R) v časových intervalech a po každém stočení byla nasazena kapka o objemu 2 μ l na desičku EasyXtal Tool.

4.3.10 Krystalizace v kapiláře

Metoda krystalizace v kapiláře [126] byla využita k optimalizaci krystalizace scFv MEM-57. Tenkostěnná kapilára z borosilikátového skla o průměru 0,1 mm (Borokapillaren, GLAS) byla naplněna 2 μ l roztoku proteinu, který byl převrstven 4 μ l

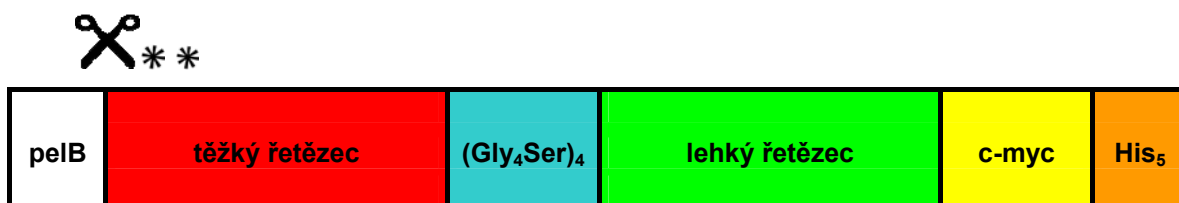
0,5% roztoku agarosy ve stejném pufru jako roztok proteinu. Po ztuhnutí byla agarosa převrstvena 40 μ l precipitačního roztoku. Jako precipitační roztoky byly použity vybrané podmínky z komerční sady PEGs Suite, případně byl precipitační roztok namíchan podle upraveného složení vybraného roztoku z komerční sady PEGs Suite. Průběh krystalizace byl sledován pomocí optických mikroskopů Nikon SMZ660 a Olympus SZX10, krystalizační kapky byly fotografovány pomocí fotoaparátu Olympus E-620 (software QuickPHOTO CAMERA 2.3).

5 Výsledky

5.1 Příprava scFv MEM-57 rekombinantní exprese v *Escherichia coli*

Při amplifikaci cDNA, kódující variabilní doménu těžkého řetězce MEM-57, byla v několika nezávislých PCR reakcích získána varianta s atypickými aminokyselinami v pozicích 9 a 11: H9Gly-H11Pro (číslování podle [127]). V těchto pozicích se však nejčastěji vyskytují aminokyseliny alanin a leucin [127], a proto byla cílenou mutagenesí připravena i varianta H9Ala-H11Leu. S oběma variantami bylo pracováno paralelně při přípravě, charakterizaci a krystalizaci, aby mohla být sledována antigen vazebná aktivita a další vlastnosti atypické varianty H9Gly-H11Pro v porovnání s variantou H9Ala-H11Leu. Úspěšná krystalizace obou variant by také mohla vést k získání informací o vlivu přítomnosti těchto aminokyselin v daných pozicích na strukturu scFv MEM-57.

Produkt genu pro exprese fragmentu scFv MEM-57, schematicky zobrazený na obrázku 7, je opatřen N-koncovou signální sekvencí pelB pro transport do periplasmy, která je enzymově odštěpena při průchodu proteinu přes vnitřní membránu *E. coli* [128]. Tak vzniká konečný produkt scFv MEM-57 o délce 267 aminokyselin, který je tvořen sekvencí těžkého řetězce propojenou pomocí peptidu (Gly₄Ser)₄ se sekvencí lehkého řetězce. C-konec scFv je dále vybaven epitopem c-myc, sloužícím k identifikaci fragmentu pomocí imunodetekce, a His₅-kotvou pro snadnou purifikaci pomocí chelatační chromatografie.



Obrázek 7: Schéma fragmentu scFv MEM-57

pelB - signální sekvence odštěpená během transportu do periplasmy

(Gly₄Ser)₄ - spojovací peptid

hvězdičky značí posice H9 a H11

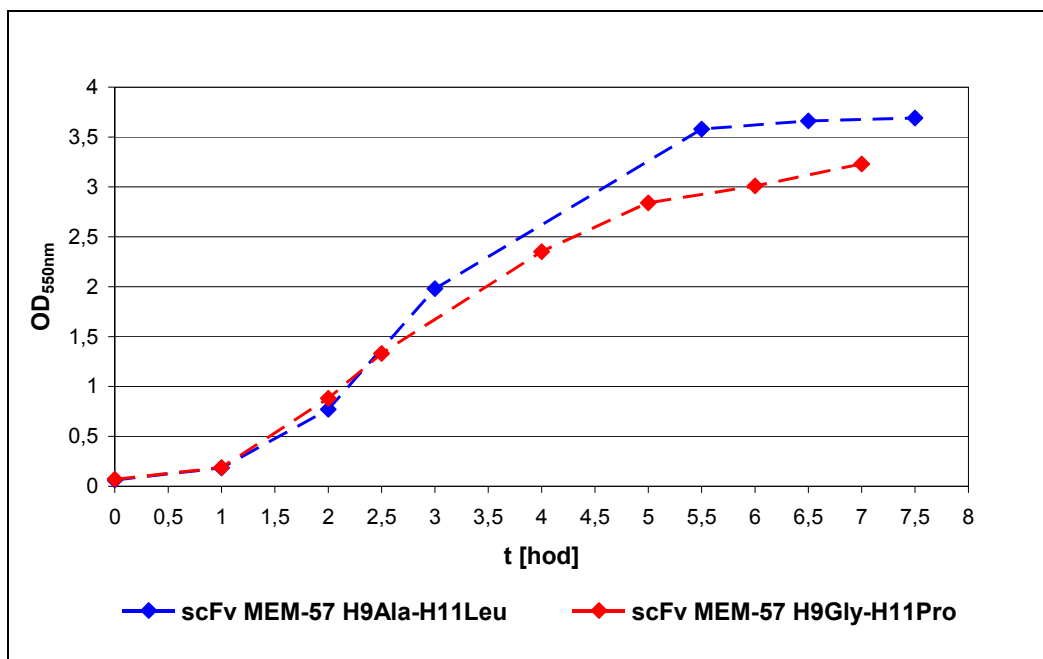
5.1.1 Heterologní exprese

Obě varianty scFv MEM-57 byly připravovány v heterologním expresním systému *Escherichia coli*, kmen BL21 (DE3). Bakteriální expresní systém postrádá glykosylační aparát, to však u fragmentů scFv nepředstavuje problém, jelikož molekula imunoglobulinu obsahuje glykosylační místa v Fc oblasti a úlohou této glykosylace je především stabilisace molekuly, není tedy nezbytná pro vazbu antigenu [33, 129].

Fragmenty scFv MEM-57 byly exprimovány v hostitelském kmeni *E. coli* BL21 (DE3) z mnohokopiového expresního plasmidu, v němž je gen pod kontrolou promotoru z fága T7. Hostitelský kmen obsahuje gen pro T7 RNA-polymerasu, vnesený transdukcí derivátem fága λ . RNA-polymerasa fága T7 specificky rozpoznává T7 promotor a syntetizuje RNA až pětikrát rychleji než RNA-polymerasa *E. coli* [130]. Gen pro T7 RNA-polymerasu je v genomu *E. coli* BL21 (DE3) během transkripce kontrolován promotorem p_{lacUV5} . Transkripce genu pro T7 RNA-polymerasu je reprimována prostřednictvím produktu genu *lacI*, lze ji snadno indukovat laktosou, IPTG nebo ETG. Tato represe promotoru p_{lacUV5} zodpovídá za nízkou hladinu T7 RNA-polymerasy v bakteriích před indukcí exprese rekombinantního proteinu. Gen pro represor *lacI* je přítomen nejen v bakteriálním genomu, ale rovněž na plasmidech pET série, a to v mutované formě s účinnějším promotorem *lacI^q*.

Optimalizovaný protokol pro expresi scFv MEM-57 je popsán v části 4.3.1.1 Rekombinantní exprese (str. 31). Na obrázku 8 (str. 44) jsou uvedeny reprezentativní růstové křivky bakteriálních kultur při produkci obou variant fragmentů, v exponenciální fázi byla provedena indukce buněk přidavkem ETG (analog IPTG). Výtěžek vlhké biomasy z 1 litru kultivačního média se u varianty H9Ala-H11Leu pohyboval kolem 8 g, u varianty H9Gly-H11Pro byl tento výtěžek nižší (5 - 6 g).

Vznik cytoplasmatických inklusních tělísek byl vyloučen na základě pozorování buněk v různých fázích růstu kultury fázově kontrastním mikroskopem. Byl sice pozorován vznik malého množství periplasmatických inklusí, nicméně protein byl v tomto kompartmentu přítomen převážně v rozpustné formě.



Obrázek 8: Bakteriální růstové křivky *E. coli* BL21 (DE3) při produkci fragmentů scFv MEM-57 do periplasmy

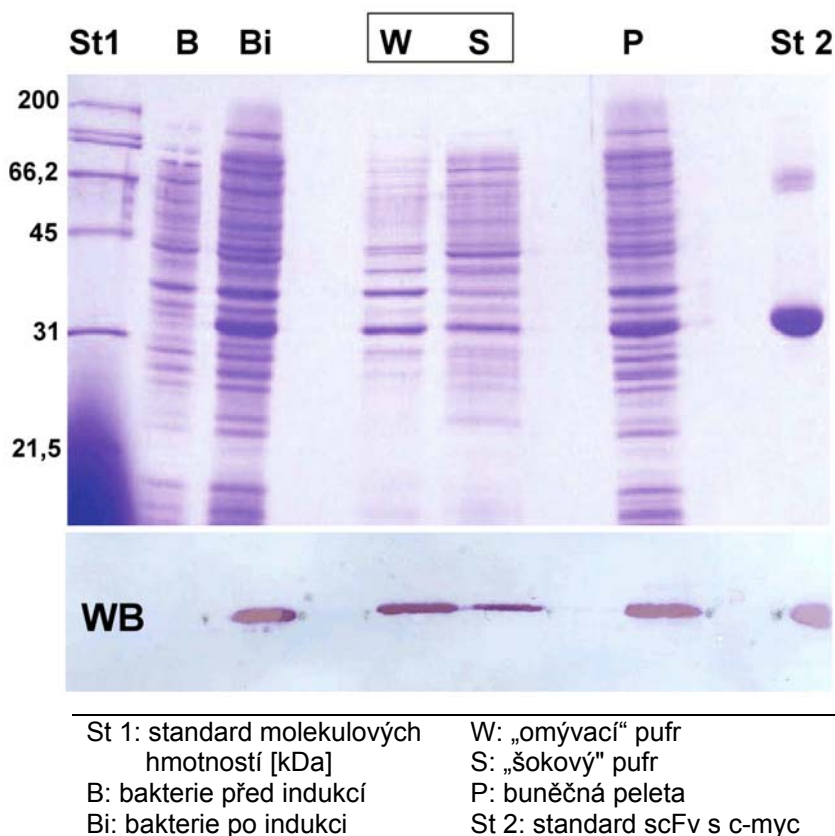
5.1.2 Isolace

Expres rekombinantního proteinu do periplasmatického prostoru poskytuje mnohé výhody, ale i nevýhody. Výhodou je například eliminace možnosti nespecifického štěpení rekombinantního produktu v cytoplasmě bakterií, kde je lokalizována většina hostitelských proteas. Oxidační prostředí periplasmy také napomáhá správnému utvoření disulfidových můstků. Další výhodou jsou poměrně jednoduché a universální isolační postupy, které poskytují hrubý preparát značně nabohacený rozpustným rekombinantním proteinem [33, 131]. Nevýhodou naopak může být limitovaná velikost periplasmatického prostoru, vedoucí k nižším výtěžkům rekombinantního proteinu.

Metoda selektivní izolace obsahu periplasmy je založena na osmotickém šoku. Nejprve jsou bakteriální buňky omyty hypertonickým roztokem pro odstranění zbytků kultivačního média a dalších nečistot. Poté jsou buňky vystaveny šoku v hypotonickém roztoku, jehož následkem je prasknutí vnější bakteriální membrány a selektivní uvolnění obsahu periplasmatického prostoru do isolačního pufru [30].

Optimalizovaný protokol izolace obsahu prostoru periplasmy je popsán v části 4.3.1.2. Isolace (str. 32). Obrázek 9 (str. 45) ilustruje analýzu jednotlivých kroků izolace periplasmatických proteinů pomocí SDS-PAGE. Z této analýzy je zřejmé, že rekombinantní protein o molekulové hmotnosti přibližně 28 500 Da [101] se v buňkách

vyskytoval až po indukci ETG. Během isolačního procesu se část rekombinantního proteinu uvolnila již do „omývacího“ pufru, zbytek proteinu byl izolován „šokovým“ pufrům. Oba isolační supernatanty byly proto pro další zpracování spojeny. Fotografie membrány po WB přenosu ve spodní části obrázku 9 prokazuje identitu rekombinantního proteinu na základě vzniku barevného produktu enzymové reakce po imunodetekci c-myc epitopu specifickou protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou.

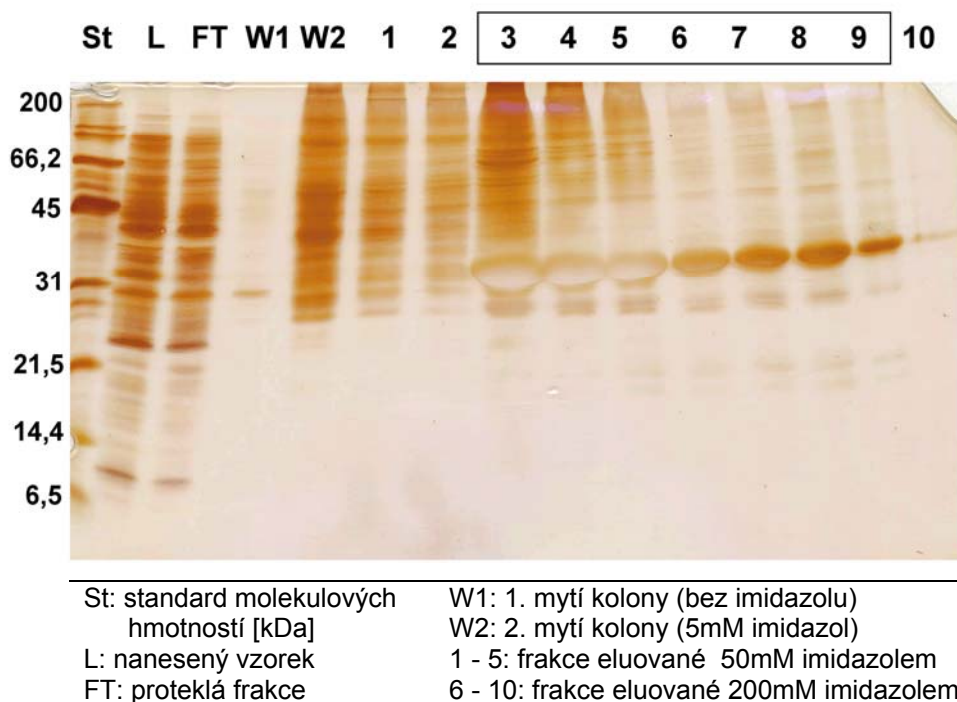


Obrázek 9: Isolace rozpustných rekombinantních fragmentů scFv z periplasmy *E. coli* BL21 (DE3) Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí 15% SDS-PAGE za neredukujících podmínek a WB přenosem s imunodetekcí (WB). Isolační supernatanty spojené pro další zpracování jsou označeny rámečkem.

5.1.3 Purifikace

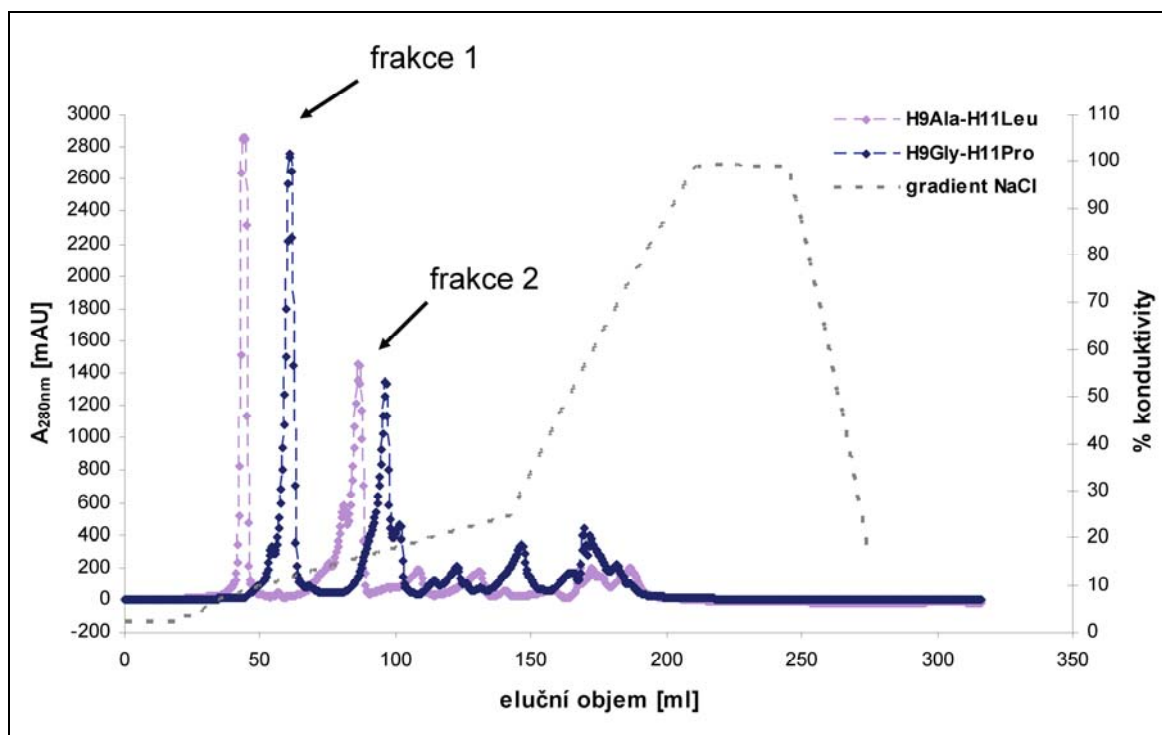
Přítomnost C-koncové His₅-kotvy dovolila významné nabohacení vzorku scFv MEM-57 pomocí chelatační chromatografie na nosiči Ni-CAM HC Resin. Průběh chromatografie byl z důvodu absorpce imidazolu při vlnové délce 280 nm analyzován pomocí SDS-PAGE (obrázek 10, str. 46). Analýza ukázala, že rekombinantní protein se

na kolonu vázal velmi dobře a většina ho byla eluována v přítomnosti 50 - 200mM imidazolu ve frakcích 3 – 9, které byly spojeny pro další purifikaci.

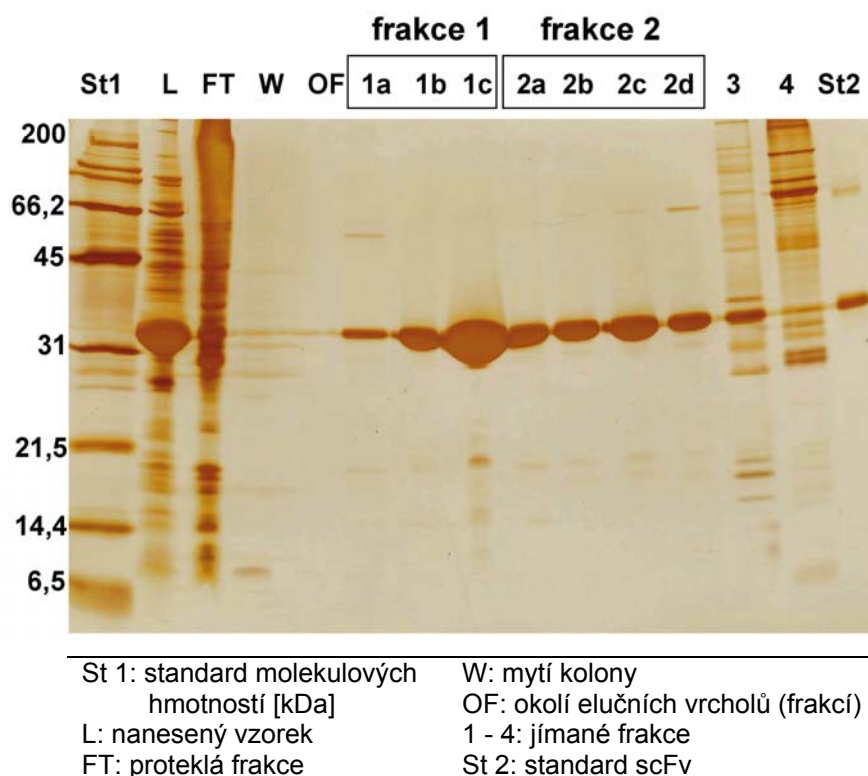


Obrázek 10: Analýza průběhu chelatační chromatografie na Ni-CAM HC Resin pomocí 15% SDS-PAGE za neredukujících podmínek
Frakce spojené pro další purifikaci jsou označeny rámečkem.

Pomocí ionexové chromatografie na koloně MonoQ byly v dalším purifikačním kroku rozděleny různé formy jednotlivých variant scFv MEM-57 a zbylé kontaminující proteiny. Proteinový vzorek byl na kolonu nanášen při pH 8,4. Tato hodnota je nad hodnotou teoretického isoelektrického bodu proteinu (hodnota pI vypočtená z primární sekvence je 7,68 pro variantu H9Ala-H11Leu a 7,00 pro H9Gly-H11Pro) [101], a proto má protein celkový záporný náboj. Eluce byla prováděna zvýšením iontové síly, konkrétně gradientem chloridu sodného. Reprezentativní eluční profily obou fragmentů jsou zobrazeny na chromatogramech na obrázku 11 (str. 47). Průběh ionexové chromatografie byl analyzován pomocí SDS-PAGE uvedené na obrázku 12 (str. 47). Z této analýzy je patrné, že se většina rekombinantního proteinu vyskytovala v čistých frakcích 1a - 1c a 2a - 2d. Frakce 1a - 1c byly spojeny do frakce 1 (F1) a frakce 2a - 2d byly obdobným způsobem spojeny do frakce 2 (F2; viz obrázek 11, str. 47). Následně byla ověřena antigen vazebná aktivita frakcí 1 a 2 a tyto frakce byly také dále charakterizovány.



Obrázek 11: Eluční profily purifikace rekombinantních fragmentů na koloně MonoQ (čísla frakcí odpovídají obrázku 12)



Obrázek 12: Reprezentativní analýza průběhu ionexové chromatografie na koloně MonoQ - 15% SDS-PAGE za neredukujících podmínek
Frakce, označené rámečky, odpovídají chromatogramu na obrázku 11.

Typické výtěžky jednotlivých variant scFv MEM-57 v jednotlivých frakcích, získané výše uvedeným isolačním a purifikačním postupem z 1 litru bakteriální kultury, jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Typické výtěžky scFv MEM-57

H9Ala-H11Leu		H9Gly-H11Pro	
frakce 1	frakce 2	frakce 1	frakce 2
1,25 mg	0,65 mg	2,45 mg	0,40 mg

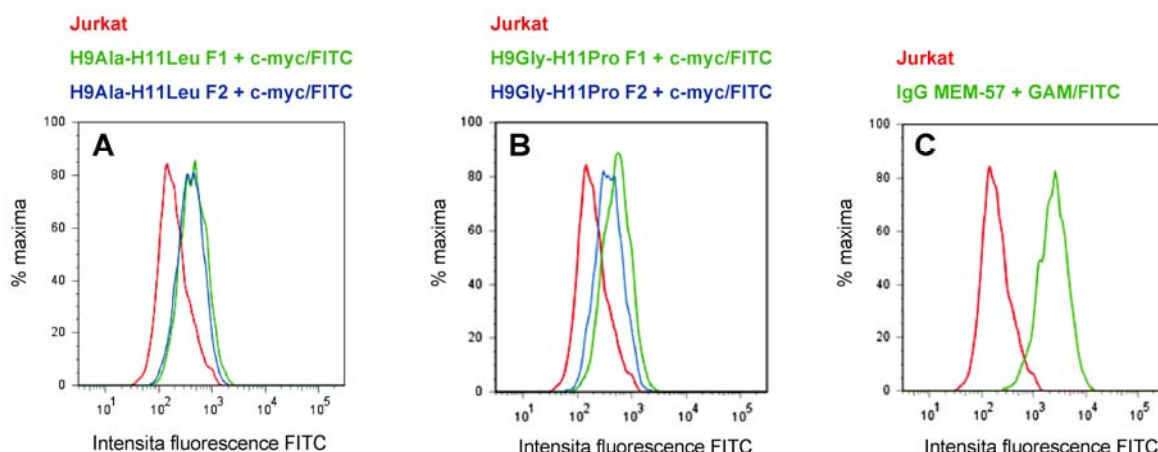
5.2 Funkční charakterizace scFv MEM-57

5.2.1 Průtoková cytometrie

Strukturní epitop protilátky MEM-57 v řetězci epsilon komplexu CD3 je tvořen pouze v případě kontaktu řetězce CD3 ϵ s řetězcem CD3 γ nebo CD3 δ , scFv MEM-57 proto rozpoznává komplex CD3 výhradně v nativním stavu na buněčné membráně [91].

Test schopnosti scFv MEM-57 vázat nativní antigen CD3 na buněčném povrchu byl proveden pomocí průtokové cytometrie. K experimentům byly použity buňky linie Jurkat, exprimující znak CD3, a buňky linie Ramos, které na svém povrchu znak CD3 neexprimují [98]. Tato metoda je detailně popsána v části 4.3.6 Průtoková cytometrie (str. 36). Analyzována byla pouze data z populace živých buněk, definované hodnotami čelního rozptylu záření a intensity fluorescence při vlnové délce emise propidium jodidu.

Na obrázku 13 (str. 49) jsou ukázány histogramy z experimentu provedeného na buněčné linii Jurkat. Histogram 13A prokazuje aktivitu obou frakcí varianty H9Ala-H11Leu, histogram 13B vypovídá o aktivitě obou frakcí varianty H9Gly-H11Pro. Pokud se scFv MEM-57 váže na antigen CD3 na povrchu buněk linie Jurkat a následně je rozpoznán i sekundární protilátkou značenou FITC, lze u takto značených buněk pozorovat posun v intensitě fluorescence při vlnové délce emise FITC proti buňkám neznačeným. Histogram 13C je pozitivní kontrola, provedená s použitím mateřské molekuly IgG MEM-57. Zde je posun v intensitě fluorescence výraznější z důvodu použití polyklonální sekundární protilátky GAM/FITC, pro kterou se na molekule IgG nachází větší množství epitopů.



Obrázek 13: Průtoková cytometrie - relativní četnost buněk vůči intensitě fluorescence FITC

červeně: histogram autofluorescence neznačených buněk linie Jurkat

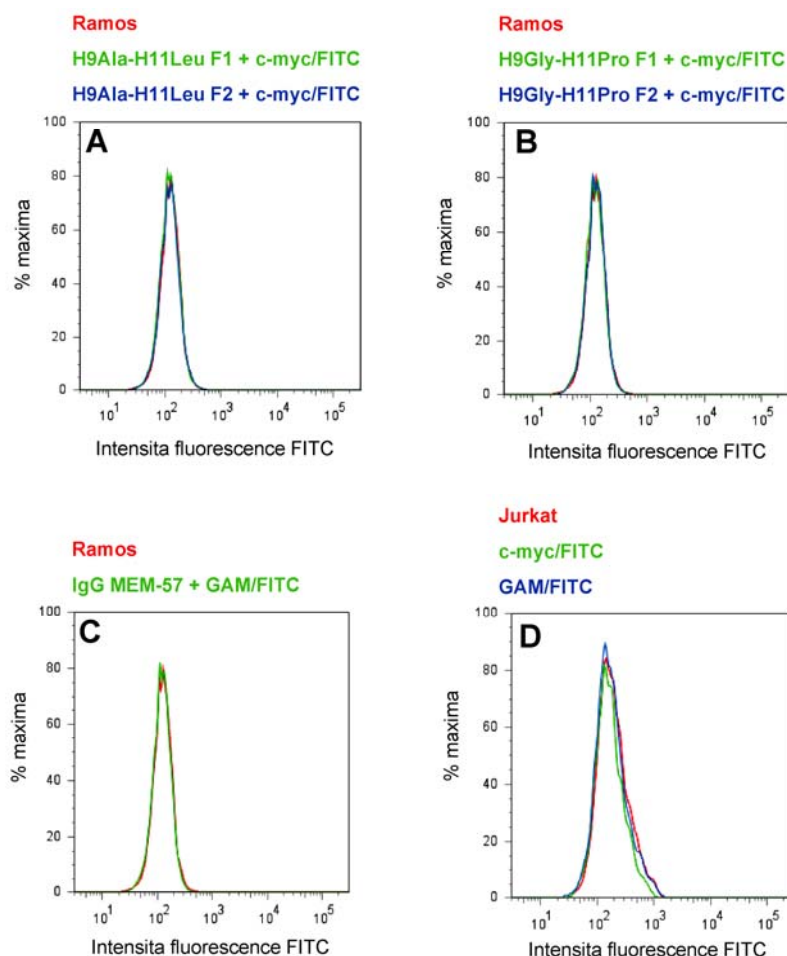
A: histogram fluorescence buněk linie Jurkat s navázaným scFv MEM-57 H9Ala-H11Leu frakce 1 (zeleně) a frakce 2 (modře) a sekundární protilátkou anti-c-myc/FITC

B: histogram fluorescence buněk linie Jurkat s navázaným scFv MEM-57 H9Gly-H11Pro frakce 1 (zeleně) a frakce 2 (modře) a sekundární protilátkou anti-c-myc/FITC

C: zeleně: histogram fluorescence buněk linie Jurkat s navázaným IgG MEM-57 a sekundární protilátkou GAM/FITC (pozitivní kontrola)

Stejná série pokusů včetně kontrol byla pro důkaz specifity vazby protilátky scFv MEM-57 provedena i na buňkách linie Ramos, které neexprimují znak CD3. Na obrázku 14 (str. 50) jsou ukázány histogramy pro obě frakce varianty H9Ala-H11Leu (histogram 14A), obě frakce varianty H9Gly-H11Pro (histogram 14B) a IgG MEM-57 (histogram 14C). Z těchto histogramů je patrné, že nedochází k žádnému posunu v intensitě fluorescence.

Na histogramu 14D je pro úplnost ukázána negativní kontrola, provedená inkubací buněk Jurkat pouze s jednotlivými sekundárními protilátkami anti-c-myc/FITC a GAM/FITC. Jelikož není patrný posun v intensitě fluorescence, nedochází k nespecifické vazbě sekundárních protilátek na buněčný povrch.



Obrázek 14: Průtoková cytometrie - relativní četnost buněk vůči intensitě fluorescence FITC
červeně: histogram autofluorescence neznačených buněk linie Ramos

A: histogram fluorescence buněk linie Ramos inkubovaných s scFv MEM-57 H9Ala-H11Leu frakce 1 (*zeleně*) a frakce 2 (*modře*) a sekundární protilátkou anti-c-myc/FITC

B: histogram fluorescence buněk linie Ramos inkubovaných s scFv MEM-57 H9Gly-H11Pro frakce 1 (*zeleně*) a frakce 2 (*modře*) a sekundární protilátkou anti-c-myc/FITC

C: *zeleně*: histogram fluorescence buněk linie Ramos inkubovaných s IgG MEM-57 a sekundární protilátkou GAM/FITC (pozitivní kontrola)

D: *zeleně*: histogram fluorescence buněk linie Jurkat inkubovaných se sekundární protilátkou anti-c-myc/FITC (negativní kontrola)

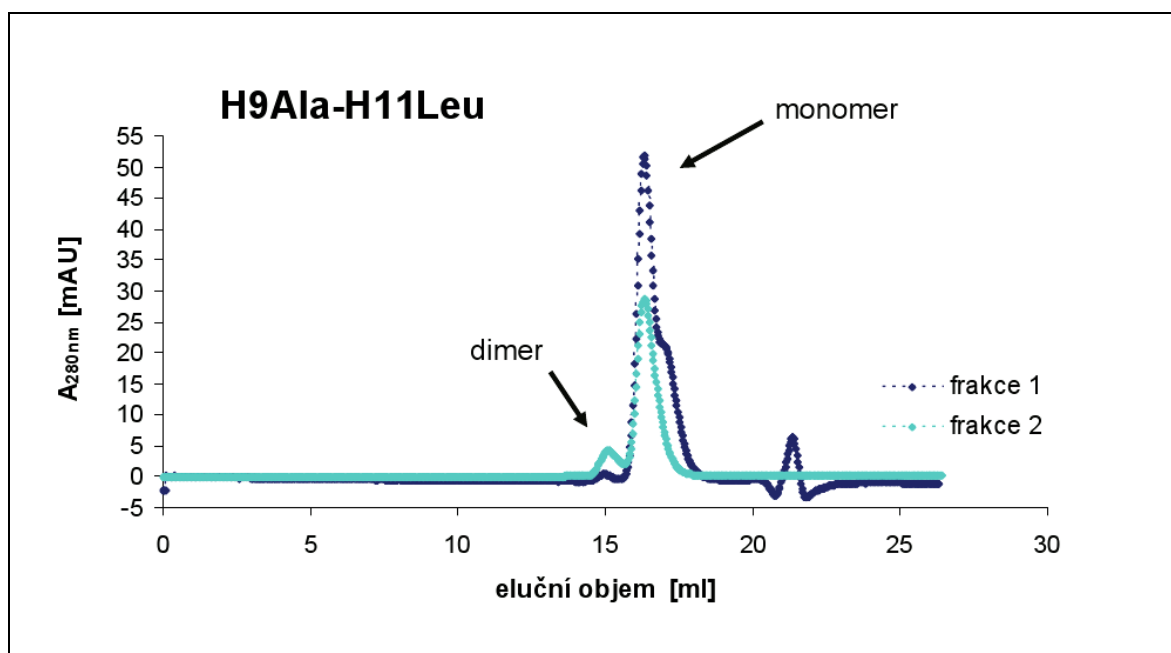
modře: histogram fluorescence buněk linie Jurkat inkubovaných se sekundární protilátkou GAM/FITC (negativní kontrola)

5.3 Charakterizace biofysikálních vlastností scFv MEM-57

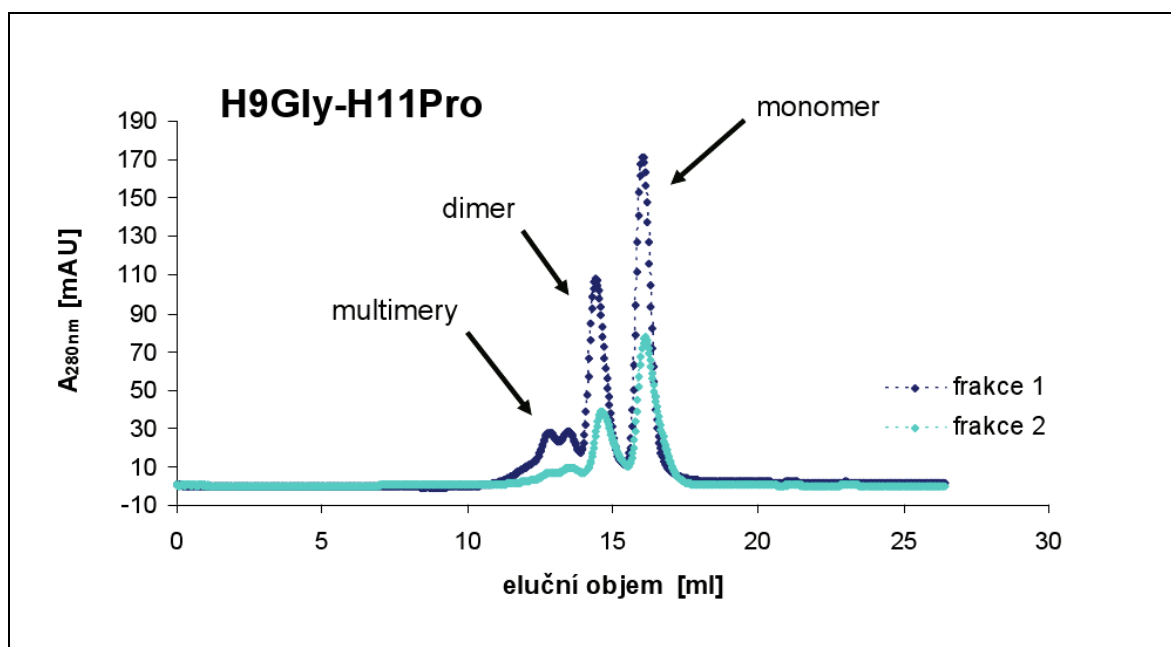
5.3.1 Analytická gelová chromatografie

Přítomnost multimerních forem obou variant scFv MEM-57 ve frakcích 1 a 2 byla zjišťována pomocí analytické gelové chromatografie na koloně Superdex 200 10/300 GL Tricorn. Tvorba nekovalentních multimerů fragmentů scFv, jejich podíl a stabilita jsou závislé na sekvenci proteinu, zejména však na délce peptidu spojujícího variabilní domény

[19, 20, 26]. Průběh gelové chromatografie pro jednotlivé varianty a frakce scFv MEM-57 je zobrazen na obrázcích 15 a 16.



Obrázek 15: Gelová chromatografie frakcí 1 a 2 scFv MEM-57 H9Ala-H11Leu na nosiči Superdex 200



Obrázek 16: Gelová chromatografie frakcí 1 a 2 scFv MEM-57 H9Gly-H11Pro na nosiči Superdex 200

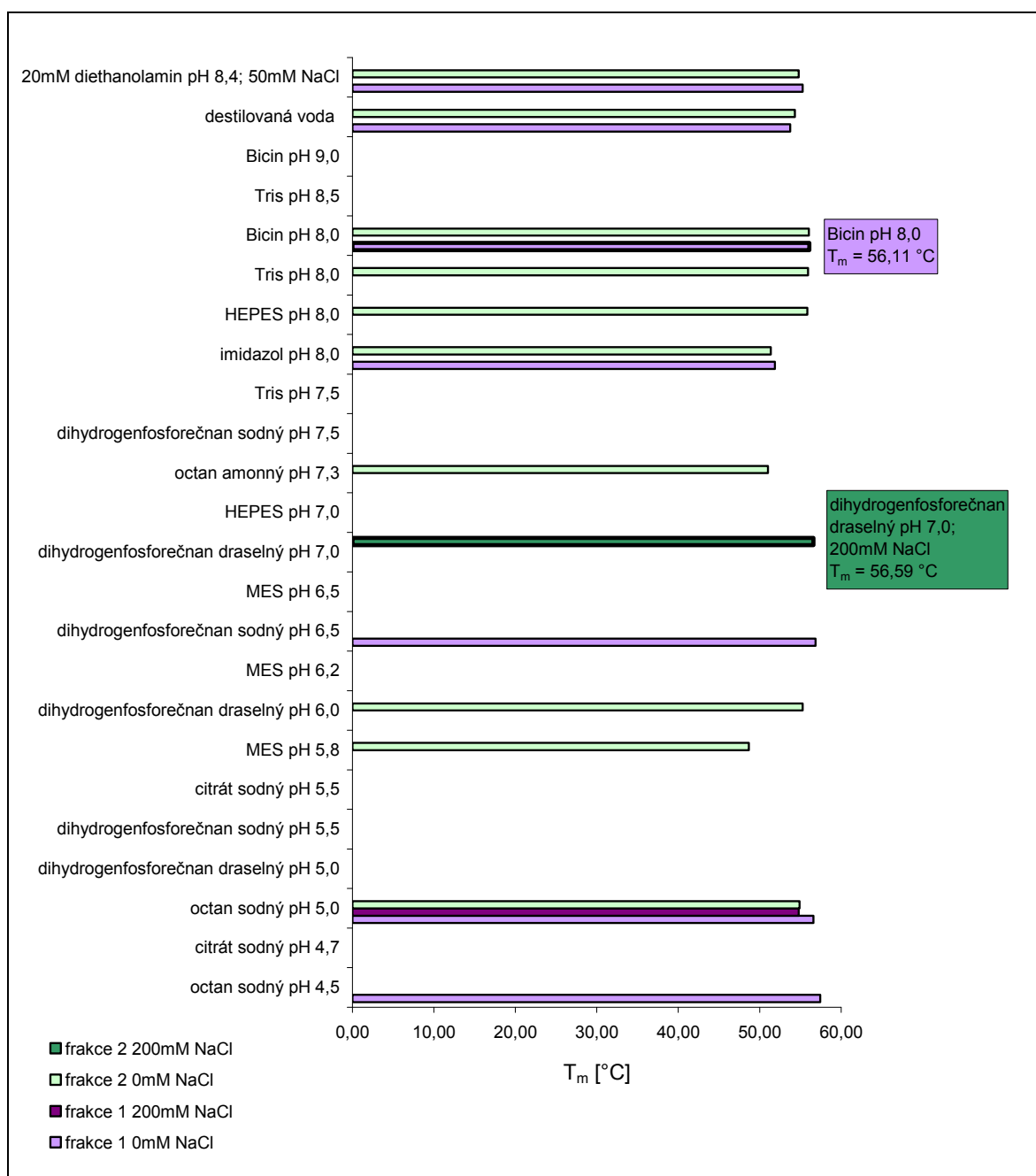
Z chromatogramů na obrázcích 15 a 16 (str. 51) je patrné, že varianta H9Ala-H11Leu tvoří malé množství dimerní formy scFv v případě frakce 2, míra dimerizace frakce 1 je zanedbatelná. Naproti tomu varianta H9Gly-H11Pro má větší tendenci tvořit oligomerní formy scFv, gelová chromatografie zde ukázala přítomnost nejen dimerní formy, ale i dalších oligomerů scFv. Zastoupení monomerní formy je zde však, na rozdíl od varianty H9Ala-H11Leu, větší ve frakci 2.

5.3.2 Diferenční skenovací fluorimetrie

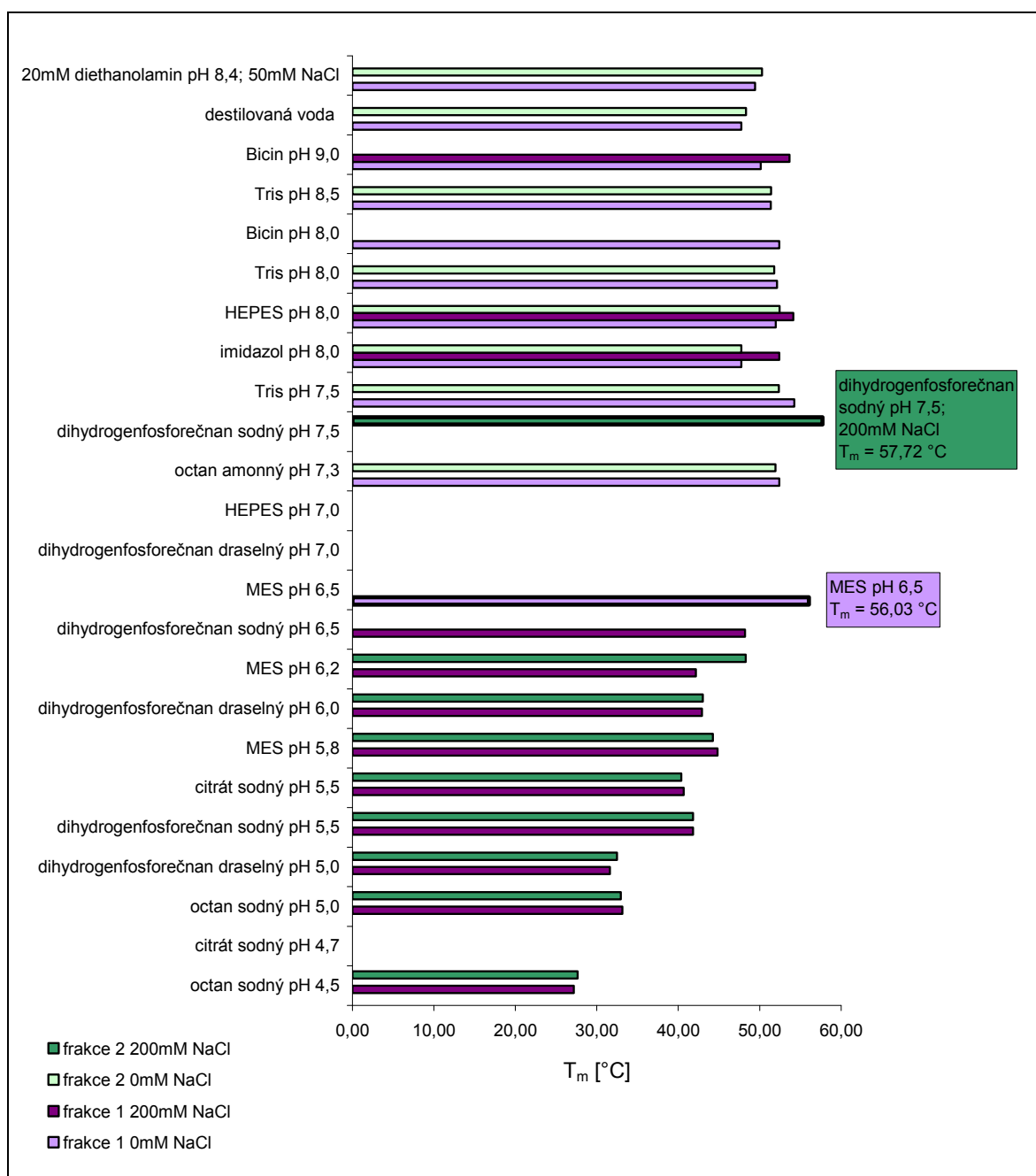
Metoda diferenční skenovací fluorimetrie využívá interakce hydrofobního fluorescenčního barviva s hydrofobním jádrem proteinu, které je postupně odhalováno během procesu denaturace, což vede k nárůstu intensity fluorescence. Pomocí této metody byla zjišťována teplotní stabilita jednotlivých forem scFv MEM-57. Porovnáním teplotní stability proteinu v různých pufrch byl vybrán výchozí pufr pro krystalizaci scFv MEM-57 tak, aby byl optimální z hlediska stability a homogenity vzorku proteinu, neboť tyto vlastnosti jsou pro krystalizaci zásadní [117].

Byla testována stabilita proteinu v pufrch s rozsahem hodnot pH 4,5 - 9,0 a též vliv přítomnosti chloridu sodného (0mM a 200mM NaCl). Pro odečítání hodnot teploty denaturace v inflexních bodech denaturačních křivek byly tyto křivky derivovány a hodnoty byly odečítány ve vzniklých minimech. Výsledky této analýzy jsou shrnuty na obrázku 17 (str. 53) pro variantu H9Ala-H11Leu a na obrázku 18 (str. 54) pro variantu H9Gly-H11Pro. Pufrы, u kterých v grafech nejsou zobrazeny pruhy reprezentující hodnoty teploty denaturace, poskytovaly denaturační křivky s více inflexními body, což vypovídá o heterogenitě vzorku proteinu. Tyto pufrы tudíž nejsou vhodné pro krystalizaci scFv MEM-57.

Jak je uvedeno na obrázcích 17 (str. 53) a 18 (str. 54), jako optimální výchozí pufrы pro krystalizaci byly zvoleny ty pufrы, ve kterých byly jednotlivé frakce a varianty scFv MEM-57 homogenní a měly nejvyšší teploty denaturace. Za povšimnutí stojí značně odlišné chování nejen dvou variant scFv MEM-57, způsobené záměnou pouze dvou aminokyselin, ale také velké rozdíly v chování dvou frakcí stejné varianty proteinu z ionexové chromatografie. U varianty H9Gly-H11Pro lze pozorovat efekt chloridu sodného, který při nízkých hodnotách pH snižuje heterogenitu vzorku proteinu, ale při pH nad pI proteinu má spíše opačný efekt.



Obrázek 17: Diferenční skenovací fluorimetrie - varianta H9Ala-H11Leu
 Koncentrace pufrů byla 100 mmol/l, T_m značí teplotu denaturace. Optimální pufr pro jednotlivé frakce jsou uvedeny v rámečcích.

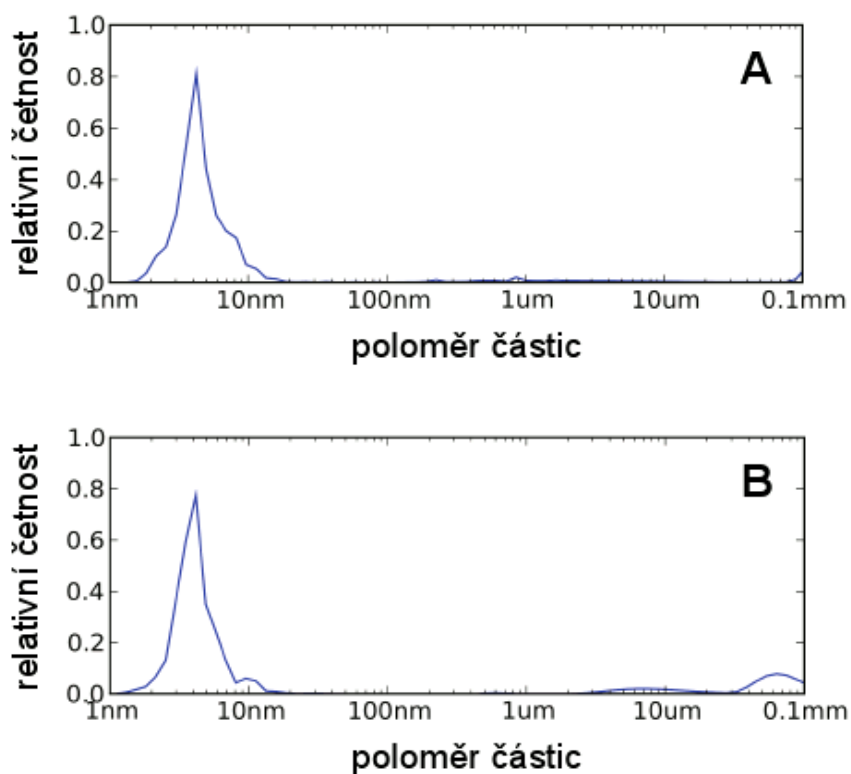


Obrázek 18: Diferenční skenovací fluorimetrie - varianta H9Gly-H11Pro
 Koncentrace pufrů byla 100 mmol/l, T_m značí teplotu denaturace. Optimální pufr pro jednotlivé frakce jsou uvedeny v rámečcích.

5.3.3 Dynamický rozptyl světla

Měření dynamického rozptylu světla na koncentrovaných vzorcích proteinů těsně před provedením krystalizačního experimentu přineslo informace o stupni dispersity vzorků. Heterogenita vzorku, v našem případě především přítomnost různých oligomerních či agregovaných forem fragmentu scFv, může mít negativní vliv na krystalizaci [119].

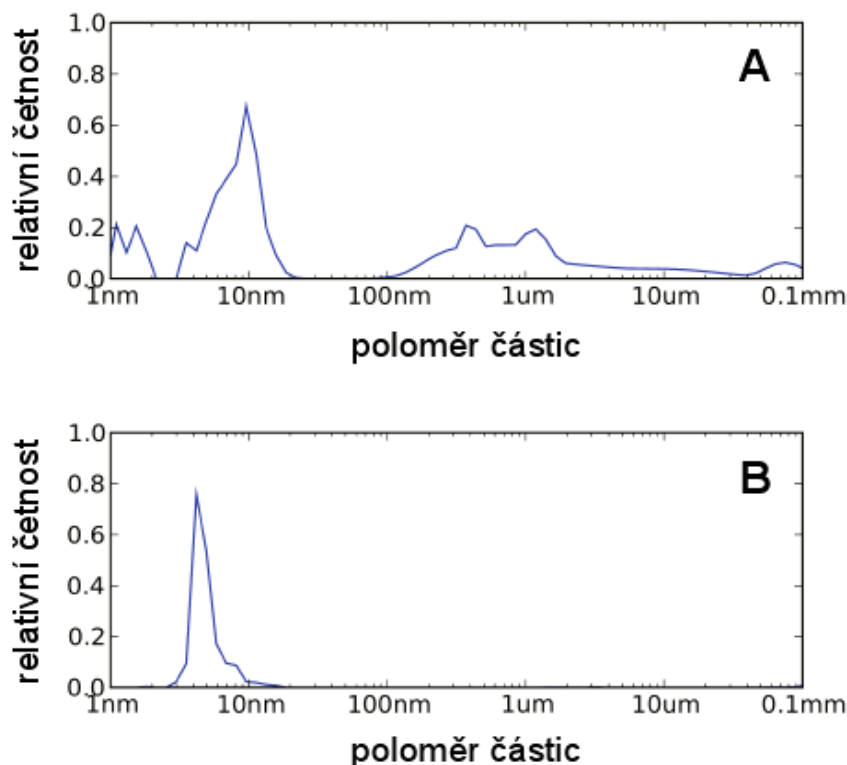
Distribuce poloměrů částic v proteinových vzorcích, získané měřením dynamického rozptylu světla na jednotlivých frakcích scFv MEM-57, jsou zobrazeny na obrázku 19 pro variantu H9Ala-H11Leu a na obrázku 20 (str. 56) pro variantu H9Gly-H11Pro.



Obrázek 19: Dynamický rozptyl světla na scFv MEM-57 H9Ala-H11Leu

A: frakce 1, koncentrace 18,5 mg/ml

B: frakce 2, koncentrace 9 mg/ml



Obrázek 20: Dynamický rozptyl světla na scFv MEM-57 H9Gly-H11Pro
A: frakce 1, koncentrace 15 mg/ml
B: frakce 2, koncentrace 15 mg/ml

5.4 Krystalizace scFv MEM-57

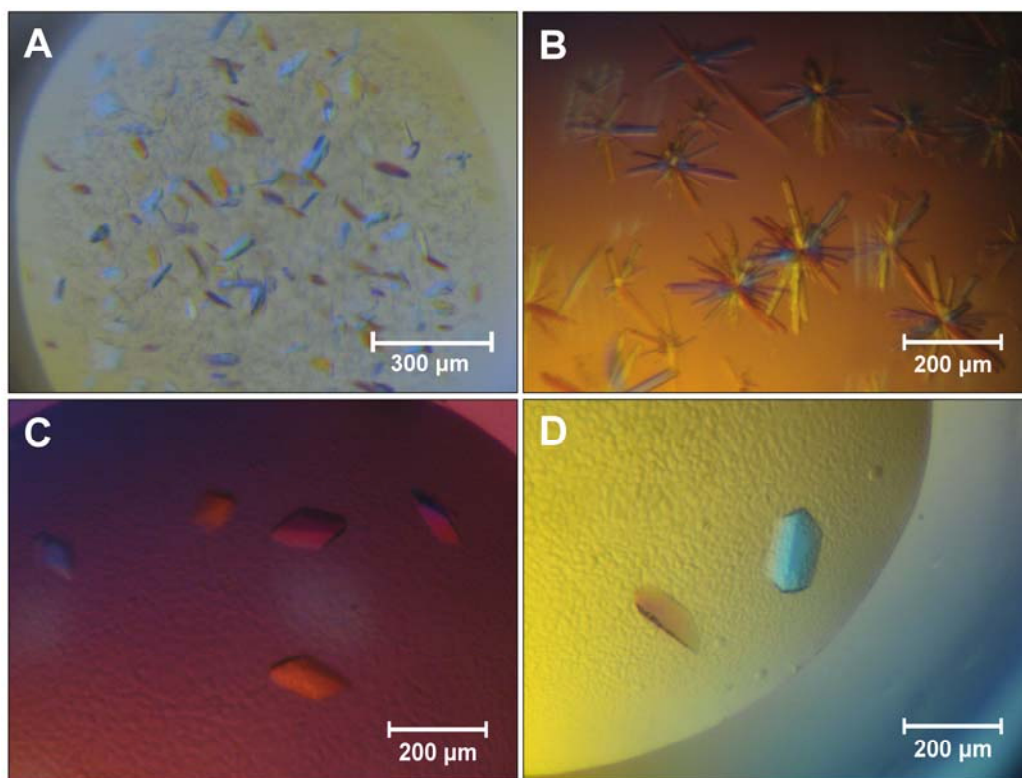
5.4.1 Hledání krystalizačních podmínek

První krystalizační pokusy, zaměřené na hledání základních krystalizačních podmínek (tzv. krystalizační "screening"), byly provedeny s frakcí 1 varianty H9Ala-H11Leu a s frakcí 1 varianty H9Gly-H11Pro. Byly nasazeny visící kapky o objemu 2 μ l, v nichž byly protein a precipitační roztok smíchány v poměru 1:1. Jako precipitační roztoky byly použity vybrané podmínky z komerční sady PEGs Suite. Výchozím pufr pro krystalizaci byl 20mM diethanolamin pH 8,4 a 50mM chlorid sodný, koncentrace proteinu se pohybovala od 4 do 8 mg/ml. Při těchto prvních pokusech nebyly získány žádné krystaly ani pro jednu z variant scFv MEM-57.

Na základě výsledků diferenční skenovací fluorimetrie byly změněny výchozí pufr pro krystalizaci (viz obrázky 17 a 18, str. 53 a 54) a pro nalezení vhodných podmínek pro krystalizaci byly provedeny krystalizační pokusy metodou sedící kapky

na 96-jamkových destičkách s využitím krystalizačního robota (viz část 4.3.9.1 Metoda sedící kapky, str. 39) a komerční sady PEGs Suite.

Výsledky těchto pokusů byly obzvláště slibné pro frakci 2 varianty H9Gly-H11Pro (koncentrace 15 mg/ml; výchozí pufr: 100mM dihydrogenfosforečnan sodný pH 7,5; 200mM chlorid sodný), která krystalizovala ve 42 z celkových 96 testovaných podmínek. Frakce 1 varianty H9Gly-H11Pro (koncentrace 15 mg/ml; výchozí pufr: 100mM MES pH 6,5) krystalizovala v 10 podmínkách, většinou ve formě mikrokrytalů. Na obrázku 21 jsou zobrazeny vybrané krystaly varianty H9Gly-H11Pro získané při prvních krystalizačních pokusech při poměru roztoku proteinu ku precipitačnímu roztoku 2:1. Na panelu A jsou zobrazeny nejlepší krystaly frakce 1, na panelu B, C a D vybrané krystaly frakce 2. Na panelu C jsou zobrazeny krystaly, které vyrostly v podmínce z komerční sady PEGs Suite, která byla následně vybrána pro většinu optimalizačních pokusů.



Obrázek 21: Vybrané krystaly varianty H9Gly-H11Pro získané při prvních krystalizačních pokusech

A: frakce 1; precipitační roztok: 200mM mravenčan amonný; 20% (w/v) PEG 3350

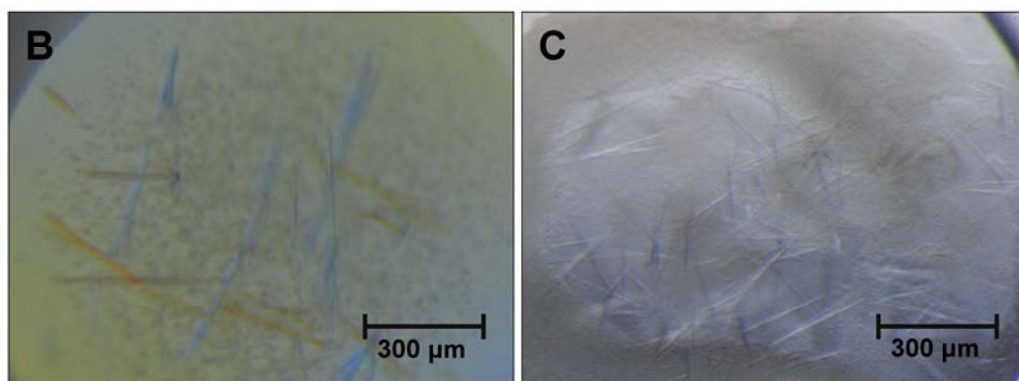
B: frakce 2; precipitační roztok: 100mM HEPES pH 7,5; 15% (w/v) PEG 20000

C: frakce 2; precipitační roztok: 200mM fluorid sodný; 20% (w/v) PEG 3350

D: frakce 2; precipitační roztok: 100mM HEPES pH 7,5; 25% (w/v) PEG 3000

fotografováno v polarisovaném světle

Frakce 1 varianty H9Ala-H11Leu (koncentrace 18,5 mg/ml; výchozí pufr: 100mM Bicin pH 8,0) krystalizovala ve 12 z 96 podmínek, tvořila však drobné tenké jehlice nevhodné pro sběr difrakčních dat. V případě frakce 2 varianty H9Ala-H11Leu (koncentrace 15,6 mg/ml; výchozí pufr: 100mM dihydrogenfosforečnan draselný pH 7,0; 200mM chlorid sodný) bylo testováno pouze 15 podmínek, vybraných podle výsledků krystalizace frakce 1 varianty H9Ala-H11Leu a obou frakcí varianty H9Gly-H11Pro, a sedící kapky byly nasazovány ručně (viz část 4.3.9.1 Metoda sedící kapky, str. 39). Tato frakce krystalizovala pouze v 1 z testovaných podmínek ve formě tenkých srostlých jehlic. Krystaly obou frakcí varianty H9Ala-H11Leu, získané při prvních krystalizačních pokusech, jsou zobrazeny na obrázku 22. Tyto krystaly vyrostly v podmínce z komerční sady PEGs Suite, která byla následně vybrána pro optimalizaci krystalizace.



Obrázek 22: Vybrané krystaly varianty H9Ala-H11Leu získané při prvních krystalizačních pokusech

A: frakce 1; precipitační roztok: 200mM citrát sodný; 20% (w/v) PEG 3350; fotografováno v polarisovaném světle

B: frakce 2; precipitační roztok: 200mM citrát sodný; 20% (w/v) PEG 3350; fotografováno v bílém světle

5.4.2 Optimalizace krystalizace

5.4.2.1 Optimalizace krystalizace varianty H9Ala-H11Leu

Pro optimalizaci krystalizace byl vybrán precipitační roztok z komerční sady PEGs Suite o složení 200mM citrát sodný, 20% (w/v) PEG 3350, ve kterém krystalizovaly obě frakce varianty H9Ala-H11Leu. Optimalizační krystalizační pokusy byly prováděny metodou visící kapky (viz část 4.3.9.2 Metoda visící kapky, str. 39) pouze s frakcí 1.

Optimalizace pH

Bylo změřeno pH vybraného precipitačního roztoku (200mM citrát sodný, 20% (w/v) PEG 3350; pH = 8,1) a byly připraveny varianty tohoto roztoku s upravenými hodnotami pH (pH = 7,1; pH = 8,7 a pH = 9,6). Při pH 8,7 byly získány silnější srostlé jehlicovité krystaly. Tímto postupem však nebyly získány trojrozměrné krystaly o větší velikosti.

Očkování krystalů

Dalším optimalizačním krokem bylo očkování krystalů [124], které však rovněž neposkytlo větší monokrystaly, neboť v kapkách, do kterých byla krystalizační jádra vnášena, vznikalo příliš velké množství krystalizačních jader samovolně. Při snaze odstranit tento problém snížením koncentrace proteinu však docházelo k precipitaci proteinu.

Snižování počtu nukleačních center

Získání krystalů vhodných pro sběr difrakčních dat bylo komplikováno přítomností velkého množství krystalizačních jader. Při snaze odstranit tento problém snížením koncentrace proteinu (z 15,4 mg/ml postupně až na 4,8 mg/ml) však docházelo k precipitaci proteinu. Tento precipitát usnadňoval nukleaci a tvorbu mnoha drobných krystalů.

Odstranění precipitátu a krystalizačních jader bylo provedeno centrifugací předem připraveného krystalizačního roztoku v časových intervalech (0,5; 6; 24; 34 a 37 hod.). Roztok, připravený smícháním roztoku proteinu (koncentrace 4,8 mg/ml) s precipitačním roztokem a roztokem aditiva, byl mezi jednotlivými centrifugacemi ponechán při 18 °C. Po každé centrifugaci byl z roztoku nasazen jeden krystalizační pokus. V kapkách se však po určitém čase vytvořil nový precipitát, na kterém následně probíhala nukleace.

Další strategií byl pokus o snížení počtu krystalizačních jader ředěním precipitačního roztoku (na 90 % a 80 %) a také přidavkem 20% glycerolu [132] do precipitačního roztoku. Za těchto podmínek protein ve většině případů precipitoval.

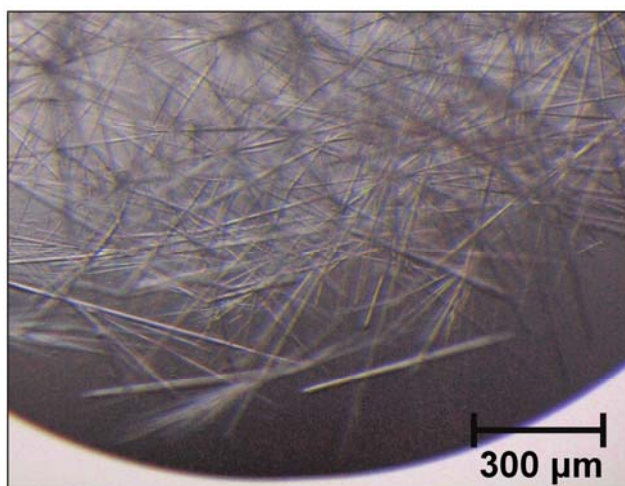
Krystalizace v kapiláře

Pro testování škály koncentrací proteinu a srážedla byla použita metoda krystalizace v kapiláře (viz část 4.3.10 Krystalizace v kapiláře, str. 40) [126]. Jako precipitační roztok

byl použit 200mM citrát sodný pH 8,7 a 25% (w/v) PEG 3350, koncentrace proteinu byla 15,6 mg/ml. Touto metodou nebyly získány žádné krystaly.

Krystalizace v přítomnosti aditiv

Zlepšení kvality krystalů bylo docíleno až přidavkem různých typů aditiv z komerční sady Additive Screen[®]. Do krystalizační kapky o objemu 3 μ l, obsahující roztok proteinu a precipitační roztok v poměru 2:1, bylo přidáno 0,3 μ l roztoku aditiva. Jako nejlepší aditiva se jevily chloridy dvojmocných kovů a především aminokyseliny prolin, glycin a taurin. V jejich přítomnosti docházelo k tvorbě silnějších jehlicovitých monokrystalů. Nejlepší krystaly, získané touto krystalizační metodou, jsou zobrazeny na obrázku 23.



Obrázek 23: Krystaly frakce 1 varianty H9Ala-H11Leu získané při optimalizaci krystalizace
výchozí pufr: 100mM Bicin pH 8,0
koncentrace proteinu: 11,2 mg/ml
precipitační roztok: 200mM citrát sodný; 20% (w/v) PEG 3350; pH 8,1
aditivum: 1M glycin
fotografováno v bílém světle

5.4.2.2 Optimalizace krystalizace varianty H9Gly-H11Pro

Na základě slibných výsledků prvního krystalizačního pokusu byla pro optimalizaci vybrána frakce 2. Prvním optimalizačním krokem bylo nasazení krystalizačních kapek o větším objemu s vybranými precipitačními roztoky z komerční sady PEGs Suite, a to v provedení sedící i visící kapky (viz části 4.3.9.1 Metoda sedící kapky a 4.3.9.2 Metoda visící kapky, str. 39), koncentrace proteinu byla 15 mg/ml. Byly získány pouze drobné

krystaly z důvodu příliš četné nukleace. Další optimalizační pokusy byly prováděny metodou visící kapky.

Hledání optimálního poměru koncentrací proteinu a precipitantu

Pro nalezení vhodných koncentračních poměrů pro optimální nukleaci a růst krystalů byly testovány různé poměry roztoku proteinu ku precipitačnímu roztoku (1:1 a 2:1), dále také různá koncentrace roztoku proteinu (19,4; 15; 12; 10; 8; 6 a 4 mg/ml) a různá koncentrace precipitačního roztoku (ředěn na 90 %, 80 % a 50 %). Ve většině případů docházelo k tvorbě precipitátu a následně mnoha drobných krystalů, podobných krystalům na obrázku 24A (str. 62). V některých případech docházelo i k tvorbě srostlých multikrystalů.

Na základě výsledků těchto optimalizačních pokusů byl pro další optimalizaci krystalizace zvolen precipitační roztok z komerční sady PEGs Suite o složení 200mM fluorid sodný, 20% (w/v) PEG 3350, v kapkách o objemu 2 μ l byl protein s precipitačním roztokem smíchán v poměru 1:1.

Zpomalení difuze par pomocí olejové bariéry

Precipitační roztok v rezervoáru byl pro zpomalení difuze par [122] převrstven směsí silikonového a parafinového oleje (Al's Oil) [123], koncentrace proteinu byla 14,6 mg/ml. Opět však byly získány drobné krystaly v precipitátu (podobné krystalům na obrázku 24A, str. 62).

Odstranění precipitující frakce proteinu metodou „heat-cut“

Za předpokladu, že frakce špatně sbalených molekul proteinu denaturuje přednostně při nižší teplotě než frakce správně sbalených molekul proteinu, mohou být špatně sbalené molekuly z roztoku odstraněny pomocí metody „heat-cut“ (viz část 4.3.9.2 Metoda visící kapky - Metoda „heat-cut“, str. 40) [125]. Pro frakci 2 scFv MEM-57 H9Gly-H11Pro byla pro daný pufr (100mM dihydrogenfosforečnan sodný pH 7,5; 200mM chlorid sodný) pomocí diferenční skenovací fluorimetrie určena teplota denaturace přibližně 58 °C. Vzorek proteinu (koncentrace 14,6 mg/ml) byl proto podroben 5 min. inkubaci při 52 °C a následné centrifugaci. V krystalizačních pokusech nasazených ze zbylého rozpustného proteinu vznikalo méně precipitátu, získané krystaly však nedosahovaly dostatečných rozměrů.

Odstranění krystalizačních jader centrifugací

Odstranění krystalizačních jader bylo provedeno centrifugací předem připraveného krystalizačního roztoku v časových intervalech (0,5; 4; 13; 17; 21,5 a 36,5 hod.). Roztok, připravený smícháním roztoku proteinu (14,1 mg/ml) s precipitačním roztokem v poměru 1:1, byl mezi jednotlivými centrifugacemi ponechán při 18 °C. Po každé centrifugaci byl z roztoku nasazen jeden krystalizační pokus. Na obrázku 24 jsou zobrazeny kapky nasazené po centrifugaci ve vybraných časových intervalech. Největší krystaly byly získány v kapce nasazené po centrifugaci po 36,5 hod. (zobrazeno na panelu C).



Obrázek 24: Krystaly frakce 2 varianty H9Gly-H11Pro získané při optimalizaci krystalizace
výchozí pufr: 100mM dihydrogenfosforečnan sodný pH 7,5; 200mM chlorid sodný
koncentrace proteinu: 14,1 mg/ml
precipitační roztok: 200mM fluorid sodný; 20% (w/v) PEG 3350
A: centrifugace po 0,5 hod. stání při 18 °C
B: centrifugace po 21,5 hod. stání při 18 °C
C: centrifugace po 36,5 hod. stání při 18 °C
fotografováno v bílém světle

Krystalizace v kapiláře

Jako alternativa k metodě difuze par byla použita metoda krystalizace v kapiláře (viz část 4.3.10 Krystalizace v kapiláře, str. 40) [126], složení použitého precipitačního roztoku z komerční sady PEGs Suite bylo 200mM fluorid sodný, 20% (w/v) PEG 3350, koncentrace proteinu byla 11,7 mg/ml. Touto metodou byly získány srostlé jehlicovité multikrystaly, ale i několik monokrystalů, jak je zobrazeno na obrázku 25 (str. 63).



Obrázek 25: Krystaly frakce 2 varianty H9Gly-H11Pro získané krystalizací v kapiláře
výchozí pufr: 100mM dihydrogenfosforečnan sodný pH 7,5; 200mM chlorid sodný
koncentrace proteinu: 11,7 mg/ml
precipitační roztok: 200mM fluorid sodný; 20% (w/v) PEG 3350
fotografováno v polarisovaném světle

6 Diskuse

Podle optimalizovaného expresního a purifikačního protokolu, popsaného v části 4.3 Experimentální metody (str. 31), byly připraveny dvě varianty rekombinantního protilátkového fragmentu scFv MEM-57, lišící se aminokyselinami v pozici 9 a 11 těžkého řetězce. Celkový výtěžek varianty H9Ala-H11Leu s běžnými aminokyselinami v daných pozicích byl 10,45 mg, což odpovídá 1,90 mg na 1 l bakteriální kultury. Celkový výtěžek varianty H9Gly-H11Pro s atypickými aminokyselinami v daných pozicích byl 15,68 mg, což odpovídá 2,85 mg na 1 l bakteriální kultury. Tyto hodnoty jsou v souladu s typickými výtěžky rekombinantních protilátkových fragmentů scFv z periplasmy *E. coli* uváděnými v literatuře (1 až 4 mg na 1 l média [30, 32]). Rozdíl ve výtěžcích jednotlivých variant scFv MEM-57 může být způsoben právě záměnou zmíněných dvou aminokyselin, neboť je známo, že výtěžek rozpustného aktivního proteinu je do velké míry závislý na jeho primární sekvenci [133].

Obě varianty byly při purifikaci pomocí ionexové chromatografie získány ve dvou frakcích, se kterými bylo dále pracováno odděleně, neboť zejména při charakterizaci biofysikálních vlastností vykazovaly velmi odlišné chování.

Výsledky testů vazby nativního antigenu CD3 na povrchu buněk Jurkat metodou průtokové cytometrie prokázaly nejen aktivitu obou frakcí varianty H9Ala-H11Leu, ale také aktivitu obou frakcí atypické varianty H9Gly-H11Pro. Tyto výsledky jsou v souladu s předpokladem, že záměna dvou aminokyselin v pozicích H9 a H11 pravděpodobně nebude mít na vazbu antigenu zásadní vliv, jelikož aminokyseliny v těchto pozicích nejsou přímo odpovědné za vazbu antigenu, ale tvoří pouze podpůrné „lešení“ pro hypervariabilní antigen vázající smyčky [4, 127].

Analýza tvorby nekovalentních oligomerů fragmentů scFv MEM-57 pomocí gelové chromatografie ukázala rozdíly v oligomerizaci mezi jednotlivými variantami scFv MEM-57. Toto pozorování odpovídá faktu, že podíl a stabilita oligomerů fragmentů scFv jsou závislé nejen na délce peptidu, spojujícího variabilní domény, ale také na sekvenci proteinu [19, 20, 26]. Rozdíl v zastoupení oligomerů v jednotlivých frakcích dané varianty scFv MEM-57 by například mohl být způsoben drobnými konformačními rozdíly mezi proteinem, přítomným v jednotlivých frakcích, které však neovlivňují strukturu antigen vazebného místa, takže si obě frakce zachovávají schopnost vazby antigenu.

Snížení homogenity vzorku proteinu v důsledku nekovalentní oligomerizace fragmentů scFv může představovat problém při krystalizaci [117]. Řešením byla změna výchozího pufru pro krystalizaci. Nový výchozí pufr, který byl optimální z hlediska stability a homogenity vzorku proteinu, byl vybrán na základě porovnání denaturačních křivek a teplot denaturace metodou diferenční skenovací fluorimetrie. V části 5.3.2 Diferenční skenovací fluorimetrie (str. 52) lze opět pozorovat odlišné chování všech frakcí obou variant scFv MEM-57. Pro všechny proteinové vzorky však byl nejvhodnější pufr o hodnotě pH nepříliš vzdálené od pI proteinu, frakce 2 obou variant byly stabilisovány fosfátovým pufrem s vyšší iontovou silou ve formě 200mM chloridu sodného. Rozdíl v pH optimálního pufru pro frakce 2 jednotlivých variant (pH 7,0 pro variantu H9Ala-H11Leu a pH 7,5 pro H9Gly-H11Pro) odpovídá rozdílu v teoretických hodnotách pI těchto variant (pI 7,68 pro variantu H9Ala-H11Leu a pI 7,00 pro H9Gly-H11Pro [101]). Výsledky následných krystalizačních pokusů potvrdily zásadní vliv složení výchozího pufru na krystalizaci [117]. Krystaly byly získány až v optimálním pufru, při krystalizačních pokusech s 20mM diethanolaminem pH 8,4 a 50mM chloridem sodným jako výchozím pufrem pro obě varianty scFv MEM-57 nebyly získány žádné krystaly.

Stupeň dispersity koncentrovaných proteinových vzorků byl analyzován těsně před krystalizací měřením dynamického rozptylu světla. Touto metodou byla ověřena homogenita frakce 1 varianty H9Ala-H11Leu a frakce 2 varianty H9Gly-H11Pro. Frakce 2 varianty H9Ala-H11Leu obsahovala určitý podíl agregátů a frakce 1 varianty H9Gly-H11Pro měla polydispersní charakter, což vedlo k předpokladu, že tyto frakce budou z důvodu heterogenity špatně krystalizovat [119].

Odhady průběhu krystalizace jednotlivých frakcí a variant scFv MEM-57, vytvořené na základě výsledků dynamického rozptylu světla, byly potvrzeny prvními krystalizačními pokusy. V případě varianty H9Ala-H11Leu krystalizovala lépe homogenní frakce 1, v případě varianty H9Gly-H11Pro krystalizovala monodispersní frakce 2 ve čtyřikrát větším počtu testovaných podmínek než polydispersní frakce 1 a také tvořila trojrozměrné monokrystaly o větší velikosti.

Při optimalizaci krystalizace obou variant scFv MEM-57 se jako největší problém jeví vznik příliš mnoha krystalizačních zárodků, který limituje konečnou velikost krystalů. Dalším problémem je také vznik precipitátu, který vede ke snížení množství proteinu, využitelného pro tvorbu krystalů. Přítomnost precipitátu v krystalizační kapce zároveň v některých případech podporuje nadměrnou tvorbu krystalizačních zárodků. Většina dosud

využitých krystalizačních přístupů pro potlačení nukleace však zatím nevedla k přípravě dostatečně velkých krystalů scFv MEM-57, a proto bude nutné krystalizační proces v budoucnu dále optimalizovat s využitím dalších krystalizačních metod a postupů.

7 Závěr

V literární rešerši byly shrnuty informace o monoklonálních protilátkách a rekombinantních protilátkových fragmentech s důrazem na jejich terapeutické a diagnostické využití. Pozornost byla zaměřena především na velmi slibný protilátkový formát BiTE, jehož součástí je protilátkový fragment scFv, rozpoznávající povrchový znak CD3. Rovněž byly shrnuty informace o povrchovém znaku CD3 a o protilátce MEM-57, která tento znak specificky rozpoznává.

V experimentální části byl vypracován postup exprese a izolace dvou variant rekombinantního fragmentu scFv MEM-57 z periplasmy *E. coli*. Dvoukrokovou purifikací pomocí chelatační a následně ionexové chromatografie bylo získáno dostatečné množství nativního proteinu pro test antigen vazebné aktivity, pro charakterizaci biofysikálních vlastností a pro krystalizaci scFv MEM-57. Z 1 litru bakteriální kultury bylo získáno 1,90 mg varianty H9Ala-H11Leu a 2,85 mg varianty H9Gly-H11Pro. Obě tyto varianty specificky vázaly nativní komplex CD3 na buněčném povrchu.

Biofysikální vlastnosti obou variant fragmentu scFv MEM-57 byly analyzovány pomocí gelové chromatografie a dynamického rozptylu světla. Diferenční skenovací fluorimetrie byla využita k nalezení vhodného výchozího pufru pro krystalizaci jednotlivých frakcí a variant scFv MEM-57. S pomocí výsledků analýz biofysikálních vlastností proteinu byly získány krystaly obou variant scFv MEM-57 již během prvních krystalizačních pokusů. Během následných optimalizačních pokusů byly získány monokrystaly větších rozměrů.

V budoucnu bude dále optimalizován proces krystalizace scFv MEM-57 s cílem získat krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Krystalová struktura scFv MEM-57 poskytne důležité strukturní informace, jež budou využity ke konstrukci a charakterizaci protilátkového fragmentu ve formátu BiTE, který bude vedle scFv MEM-57 obsahovat v jedné molekule i fragment scFv rozpoznávající nádorový antigen.

Seznam použité literatury

1. Hajdúch, M., Cwierka, K., Trojanec, R., Špačková, K., *Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii*. Klin. Farmakol. Farm., 2004. 18(3): 165-170.
2. Reichert, J.M., Rosensweig, C.J., Faden, L.B., Dewitz, M.C., *Monoclonal antibody successes in the clinic*. Nat. Biotechnol., 2005. 23(9): 1073-1078.
3. Hilgert, I., Hořejší, V., Křištofová, H., *Myší lymfocytární hybridom IMG CZAS MEM-57*. 1989, Ústav pro vynálezy a objevy, Československá socialistická republika.
4. Hořejší, V., Bartůňková, J., *Základy imunologie*. 3. ed. 2005, TRITON.
5. Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O., *Laboratorní techniky biochemie*. 1. ed. 2006, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.
6. Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. ed. 2005, W. H. Freeman.
7. George, A.J.T., Urch, C.E., *Diagnostic and Therapeutic Antibodies*. 2000, Springer.
8. van Oss, C.J., van Regenmortel, M.H.V., *Immunochemistry*. 1994, CRC Press.
9. Porter, R.R., *Lecture for the Nobel Prize for physiology or medicine 1972: Structural studies of immunoglobulins*. 1972. Scand. J. Immunol., 1991. 34(4): 381-389.
10. Inbar, D., Hochman, J., Givol, D., *Localization of antibody-combining sites within the variable portions of heavy and light chains*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1972. 69(9): 2659-2662.
11. Kohler, G., Milstein, C., *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. 256(5517): 495-497.
12. Dall'Acqua, W., Carter, P., *Antibody engineering*. Curr. Opin. Struct. Biol., 1998. 8(4): 443-450.
13. Leenaars, M., Hendriksen, C.F., *Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations*. ILAR J., 2005. 46(3): 269-279.
14. Olsson, L., Kaplan, H.S., *Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1980. 77(9): 5429-5431.
15. Jakobovits, A., *Production of fully human antibodies by transgenic mice*. Curr. Opin. Biotechnol., 1995. 6(5): 561-566.
16. Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S., Whitlow, M., *Single-chain antigen-binding proteins*. Science, 1988. 242(4877): 423-426.

17. Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E., Crea, R., *Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1988. 85(16): 5879-5883.
18. Johnson, S., Bird, R.E., *Construction of single-chain Fv derivatives monoclonal antibodies and their production in Escherichia coli*. Methods Enzymol., 1991. 203: 88-98.
19. Kortt, A.A., Lah, M., Oddie, G.W., Gruen, C.L., Burns, J.E., Pearce, L.A., Atwell, J.L., McCoy, A.J., Howlett, G.J., Metzger, D.W., Webster, R.G., Hudson, P.J., *Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer*. Protein Eng., 1997. 10(4): 423-433.
20. Atwell, J.L., Breheney, K.A., Lawrence, L.J., McCoy, A.J., Kortt, A.A., Hudson, P.J., *scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies*. Protein Eng., 1999. 12(7): 597-604.
21. Batra, S.K., Jain, M., Wittel, U.A., Chauhan, S.C., Colcher, D., *Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies*. Curr. Opin. Biotechnol., 2002. 13(6): 603-608.
22. Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, M., Schlom, J., *Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms*. Cancer Res., 1992. 52(12): 3402-3408.
23. Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B., Pastan, I., *Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments*. Nat. Biotechnol., 1996. 14(10): 1239-1245.
24. Arndt, K.M., Muller, K.M., Pluckthun, A., *Helix-stabilized Fv (hsFv) antibody fragments: substituting the constant domains of a Fab fragment for a heterodimeric coiled-coil domain*. J. Mol. Biol., 2001. 312(1): 221-228.
25. Holliger, P., Prospero, T., Winter, G., *"Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. 90(14): 6444-6448.
26. Power, B.E., Doughty, L., Shapira, D.R., Burns, J.E., Bayly, A.M., Caine, J.M., Liu, Z., Scott, A.M., Hudson, P.J., Kortt, A.A., *Noncovalent scFv multimers of tumor-targeting anti-Lewis(y) hu3S193 humanized antibody*. Protein Sci., 2003. 12(4): 734-747.
27. Holliger, P., Hudson, P.J., *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nat. Biotechnol., 2005. 23(9): 1126-1136.
28. Mallender, W.D., Voss, E.W., Jr., *Construction, expression, and activity of a bivalent bispecific single-chain antibody*. J. Biol. Chem., 1994. 269(1): 199-206.
29. de Gast, G.C., van de Winkel, J.G., Bast, B.E., *Clinical perspectives of bispecific antibodies in cancer*. Cancer Immunol. Immunother., 1997. 45(3-4): 121-123.
30. Bayly, A.M., Kortt, A.A., Hudson, P.J., Power, B.E., *Large-scale bacterial fermentation and isolation of scFv multimers using a heat-inducible bacterial expression vector*. J. Immunol. Methods, 2002. 262(1-2): 217-227.

31. Griep, R.A., van Twisk, C., Kerschbaumer, R.J., Harper, K., Torrance, L., Himmeler, G., van der Wolf, J.M., Schots, A., *pSKAP/S: An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins*. Protein Expression Purif., 1999. 16(1): 63-69.
32. Kipriyanov, S.M., Moldenhauer, G., Little, M., *High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures*. J. Immunol. Methods, 1997. 200(1-2): 69-77.
33. Skerra, A., Pluckthun, A., *Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli*. Science, 1988. 240(4855): 1038-1041.
34. FitzGerald, K., Holliger, P., Winter, G., *Improved tumour targeting by disulphide stabilized diabodies expressed in Pichia pastoris*. Protein Eng., 1997. 10(10): 1221-1225.
35. Ryabova, L.A., Desplancq, D., Spirin, A.S., Pluckthun, A., *Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones*. Nat. Biotechnol., 1997. 15(1): 79-84.
36. Kirkpatrick, R.B., Ganguly, S., Angelichio, M., Griego, S., Shatzman, A., Silverman, C., Rosenberg, M., *Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from Drosophila via a BiP-mediated pathway*. J. Biol. Chem., 1995. 270(34): 19800-19805.
37. Trill, J.J., Shatzman, A.R., Ganguly, S., *Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells*. Curr. Opin. Biotechnol., 1995. 6(5): 553-560.
38. Grunberg, J., Knogler, K., Waibel, R., Novak-Hofer, I., *High-yield production of recombinant antibody fragments in HEK-293 cells using sodium butyrate*. BioTechniques, 2003. 34(5): 968-972.
39. Ma, J.K., Drake, P.M., Christou, P., *The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants*. Nat. Rev. Genet., 2003. 4(10): 794-805.
40. Rader, C., Barbas, C.F., *Phage display of combinatorial antibody libraries*. Curr. Opin. Biotechnol., 1997. 8(4): 503-508.
41. Hanes, J., Pluckthun, A., *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1997. 94(10): 4937-4942.
42. Nowakowski, A., Wang, C., Powers, D.B., Amersdorfer, P., Smith, T.J., Montgomery, V.A., Sheridan, R., Blake, R., Smith, L.A., Marks, J.D., *Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002. 99(17): 11346-11350.
43. Maynard, J.A., Maassen, C.B., Leppla, S.H., Brasky, K., Patterson, J.L., Iverson, B.L., Georgiou, G., *Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity*. Nat. Biotechnol., 2002. 20(6): 597-601.
44. Goldenberg, D.M., *Targeted therapy of cancer with radiolabeled antibodies*. J. Nucl. Med., 2002. 43(5): 693-713.
45. Dela Cruz, J.S., Huang, T.H., Penichet, M.L., Morrison, S.L., *Antibody-cytokine fusion proteins: innovative weapons in the war against cancer*. Clin. Exp. Med., 2004. 4(2): 57-64.

46. Pastan, I., *Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins*. Biochim. Biophys. Acta, 1997. 1333(2): C1-6.
47. Martin, J., Stribbling, S.M., Poon, G.K., Begent, R.H., Napier, M., Sharma, S.K., Springer, C.J., *Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial*. Cancer Chemother. Pharmacol., 1997. 40(3): 189-201.
48. Alderson, R.F., Toki, B.E., Roberge, M., Geng, W., Basler, J., Chin, R., Liu, A., Ueda, R., Hodges, D., Escandon, E., Chen, T., Kanavarioti, T., Babe, L., Senter, P.D., Fox, J.A., Schellenberger, V., *Characterization of a CC49-based single-chain fragment-beta-lactamase fusion protein for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT)*. Bioconjugate Chem., 2006. 17(2): 410-418.
49. Carter, P., *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. Nat. Rev. Cancer, 2001. 1(2): 118-129.
50. Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., Oi, V.T., *Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1984. 81(21): 6851-6855.
51. Hurle, M.R., Gross, M., *Protein engineering techniques for antibody humanization*. Curr. Opin. Biotechnol., 1994. 5(4): 428-433.
52. Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G., *Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse*. Nature, 1986. 321(6069): 522-525.
53. Tamura, M., Milenic, D.E., Iwahashi, M., Padlan, E., Schlom, J., Kashmiri, S.V., *Structural correlates of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only*. J. Immunol., 2000. 164(3): 1432-1441.
54. Loffler, A., Kufer, P., Lutterbuse, R., Zettl, F., Daniel, P.T., Schwenkenbecher, J.M., Riethmuller, G., Dorken, B., Bargou, R.C., *A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes*. Blood, 2000. 95(6): 2098-2103.
55. Kufer, P., Mack, M., Gruber, R., Lutterbuse, R., Zettl, F., Riethmuller, G., *Construction and biological activity of a recombinant bispecific single-chain antibody designed for therapy of minimal residual colorectal cancer*. Cancer Immunol. Immunother., 1997. 45(3-4): 193-197.
56. Kufer, P., Lutterbuse, R., Baeuerle, P.A., *A revival of bispecific antibodies*. Trends Biotechnol., 2004. 22(5): 238-244.
57. Molhoj, M., Crommer, S., Brischwein, K., Rau, D., Sriskandarajah, M., Hoffmann, P., Kufer, P., Hofmeister, R., Baeuerle, P.A., *CD19-/CD3-bispecific antibody of the BiTE class is far superior to tandem diabody with respect to redirected tumor cell lysis*. Mol. Immunol., 2007. 44(8): 1935-1943.

58. Offner, S., Hofmeister, R., Romaniuk, A., Kufer, P., Baeuerle, P.A., *Induction of regular cytolytic T cell synapses by bispecific single-chain antibody constructs on MHC class I-negative tumor cells*. Mol. Immunol., 2006. 43(6): 763-771.
59. Mack, M., Riethmuller, G., Kufer, P., *A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1995. 92(15): 7021-7025.
60. Nagorsen, D., Bargou, R., Ruttinger, D., Kufer, P., Baeuerle, P.A., Zugmaier, G., *Immunotherapy of lymphoma and leukemia with T-cell engaging BiTE antibody blinatumomab*. Leuk. Lymphoma, 2009. 50(6): 886-891.
61. Hoffmann, P., Hofmeister, R., Brischwein, K., Brandl, C., Crommer, S., Bargou, R., Itin, C., Prang, N., Baeuerle, P.A., *Serial killing of tumor cells by cytotoxic T cells redirected with a CD19-/CD3-bispecific single-chain antibody construct*. Int. J. Cancer, 2005. 115(1): 98-104.
62. Wolf, E., Hofmeister, R., Kufer, P., Schlereth, B., Baeuerle, P.A., *BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity*. Drug Discovery Today, 2005. 10(18): 1237-1244.
63. Brischwein, K., Schlereth, B., Guller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbuese, R., Offner, S., Locher, M., Urbig, T., Raum, T., Kleindienst, P., Wimberger, P., Kimmig, R., Fichtner, I., Kufer, P., Hofmeister, R., da Silva, A.J., Baeuerle, P.A., *MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors*. Mol. Immunol., 2006. 43(8): 1129-1143.
64. Haas, C., Krinner, E., Brischwein, K., Hoffmann, P., Lutterbuse, R., Schlereth, B., Kufer, P., Baeuerle, P.A., *Mode of cytotoxic action of T cell-engaging BiTE antibody MT110*. Immunobiology, 2009. 214(6): 441-453.
65. Gruen, M., Bommert, K., Bargou, R.C., *T-cell-mediated lysis of B cells induced by a CD19xCD3 bispecific single-chain antibody is perforin dependent and death receptor independent*. Cancer Immunol. Immunother., 2004. 53(7): 625-632.
66. Witthauer, J., Schlereth, B., Brischwein, K., Winter, H., Funke, I., Jauch, K.W., Baeuerle, P., Mayer, B., *Lysis of cancer cells by autologous T cells in breast cancer pleural effusates treated with anti-EpCAM BiTE antibody MT110*. Breast Cancer Res. Treat., 2009. 117(3): 471-481.
67. Hammond, S.A., Lutterbuese, R., Roff, S., Lutterbuese, P., Schlereth, B., Bruckheimer, E., Kinch, M.S., Coats, S., Baeuerle, P.A., Kufer, P., Kiener, P.A., *Selective targeting and potent control of tumor growth using an EphA2/CD3-Bispecific single-chain antibody construct*. Cancer Res., 2007. 67(8): 3927-3935.
68. Wong, J.T., Eylath, A.A., Ghobrial, I., Colvin, R.B., *The mechanism of anti-CD3 monoclonal antibodies. Mediation of cytotoxicity by inter-T cell bridging*. Transplantation, 1990. 50(4): 683-689.
69. Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., Einsele, H., Brandl, C., Wolf, A., Kirchner, P., Klappers, P., Schmidt, M., Riethmuller, G., Reinhardt, C., Baeuerle, P.A., Kufer, P., *Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody*. Science, 2008. 321(5891): 974-977.

70. d'Argouges, S., Wissing, S., Brandl, C., Prang, N., Lutterbuese, R., Kozhich, A., Suzich, J., Locher, M., Kiener, P., Kufer, P., Hofmeister, R., Baeuerle, P.A., Bargou, R.C., *Combination of rituximab with blinatumomab (MT103/MEDI-538), a T cell-engaging CD19-/CD3-bispecific antibody, for highly efficient lysis of human B lymphoma cells.* Leuk. Res., 2009. 33(3): 465-473.
71. Weiss, A., *Structure and function of the T cell antigen receptor.* J. Clin. Invest., 1990. 86(4): 1015-1022.
72. Jin, Y.J., Clayton, L.K., Howard, F.D., Koyasu, S., Sieh, M., Steinbrich, R., Tarr, G.E., Reinherz, E.L., *Molecular cloning of the CD3 epsilon subunit identifies a CD3 zeta-related product in thymus-derived cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1990. 87(9): 3319-3323.
73. Wegener, A.M., Letourneur, F., Hoeveler, A., Brocker, T., Luton, F., Malissen, B., *The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules.* Cell, 1992. 68(1): 83-95.
74. Dustin, M.L., Cooper, J.A., *The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling.* Nat. Immunol., 2000. 1(1): 23-29.
75. Drbal, K., Moertelmaier, M., Holzhauser, C., Muhammad, A., Fuertbauer, E., Howorka, S., Hinterberger, M., Stockinger, H., Schutz, G.J., *Single-molecule microscopy reveals heterogeneous dynamics of lipid raft components upon TCR engagement.* Int. Immunol., 2007. 19(5): 675-684.
76. Gil, D., Schamel, W.W., Montoya, M., Sanchez-Madrid, F., Alarcon, B., *Recruitment of Nck by CD3 epsilon reveals a ligand-induced conformational change essential for T cell receptor signaling and synapse formation.* Cell, 2002. 109(7): 901-912.
77. Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., Wucherpfennig, K.W., *The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex.* Cell, 2002. 111(7): 967-979.
78. Kearse, K.P., Roberts, J.L., Singer, A., *TCR alpha-CD3 delta epsilon association is the initial step in alpha beta dimer formation in murine T cells and is limiting in immature CD4+ CD8+ thymocytes.* Immunity, 1995. 2(4): 391-399.
79. Punt, J.A., Roberts, J.L., Kearse, K.P., Singer, A., *Stoichiometry of the T cell antigen receptor (TCR) complex: each TCR/CD3 complex contains one TCR alpha, one TCR beta, and two CD3 epsilon chains.* J. Exp. Med., 1994. 180(2): 587-593.
80. Call, M.E., Wucherpfennig, K.W., *Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex.* Mol. Immunol., 2004. 40(18): 1295-1305.
81. San Jose, E., Sahuquillo, A.G., Bragado, R., Alarcon, B., *Assembly of the TCR/CD3 complex: CD3 epsilon/delta and CD3 epsilon/gamma dimers associate indistinctly with both TCR alpha and TCR beta chains. Evidence for a double TCR heterodimer model.* Eur. J. Immunol., 1998. 28(1): 12-21.
82. Exley, M., Wileman, T., Mueller, B., Terhorst, C., *Evidence for multivalent structure of T-cell antigen receptor complex.* Mol. Immunol., 1995. 32(11): 829-839.
83. Arechaga, I., Swamy, M., Abia, D., Schamel, W.A., Alarcon, B., Valpuesta, J.M., *Structural characterization of the TCR complex by electron microscopy.* Int. Immunol., 22(11): 897-903.

84. Alarcon, B., Swamy, M., van Santen, H.M., Schamel, W.W., *T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity*. EMBO Rep., 2006. 7(5): 490-495.
85. Park, D.J., Rho, H.W., Rhee, S.G., *CD3 stimulation causes phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 on serine and tyrosine residues in a human T-cell line*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1991. 88(12): 5453-5456.
86. Weiss, A., Littman, D.R., *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors*. Cell, 1994. 76(2): 263-274.
87. Cantrell, D., *T cell antigen receptor signal transduction pathways*. Annu. Rev. Immunol., 1996. 14: 259-274.
88. Huang, Y., Wange, R.L., *T cell receptor signaling: beyond complex complexes*. J. Biol. Chem., 2004. 279(28): 28827-28830.
89. Tunnacliffe, A., Olsson, C., de la Hera, A., *The majority of human CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain*. Int. Immunol., 1989. 1(5): 546-550.
90. Salmeron, A., Sanchez-Madrid, F., Ursa, M.A., Fresno, M., Alarcon, B., *A conformational epitope expressed upon association of CD3-epsilon with either CD3-delta or CD3-gamma is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies*. J. Immunol., 1991. 147(9): 3047-3052.
91. Horejsi, V., Angelisova, P., Bazil, V., Kristofova, H., Stoyanov, S., Stefanova, I., Hausner, P., Vosecky, M., Hilgert, I., *Monoclonal antibodies against human leucocyte antigens. II. Antibodies against CD45 (T200), CD3 (T3), CD43, CD10 (CALLA), transferrin receptor (T9), a novel broadly expressed 18-kDa antigen (MEM-43) and a novel antigen of restricted expression (MEM-74)*. Folia Biol. (Prague, Czech Repub.), 1988. 34(1): 23-34.
92. Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L., Schlossman, S.F., *Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens*. Science, 1979. 206(4416): 347-349.
93. Pan, Q., Brodeur, J.F., Drbal, K., Dave, V.P., *Different role for mouse and human CD3delta/epsilon heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: human CD3delta/epsilon heterodimer restores the defective preTCR function in CD3gamma- and CD3gammadelta-deficient mice*. Mol. Immunol., 2006. 43(11): 1741-1750.
94. Kjer-Nielsen, L., Dunstone, M.A., Kostenko, L., Ely, L.K., Beddoe, T., Mifsud, N.A., Purcell, A.W., Brooks, A.G., McCluskey, J., Rossjohn, J., *Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2004. 101(20): 7675-7680.
95. Sgro, C., *Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review*. Toxicology, 1995. 105(1): 23-29.
96. Chatenoud, L., *CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside*. Nat. Rev. Immunol., 2003. 3(2): 123-132.
97. Goldstein, G., *Overview of the development of Orthoclone OKT3: monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation*. Transplant. Proc., 1987. 19(2, dod. 1): 1-6.
98. ATCC Cultures and Products. 2011 [citováno 4.4.2011]; dostupné z: <http://www.lgcstandards-atcc.org/>.

99. Kapralek, F., Jecmen, P., Sedlacek, J., Fabry, M., Zadrazil, S., *Fermentation conditions for high-level expression of the tac-promoter-controlled calf prochymosin cDNA in Escherichia coli HB101*. Biotechnol. Bioeng., 1991. 37(1): 71-79.
100. Whitaker, J.R., Granum, P.E., *An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm*. Anal. Biochem., 1980. 109(1): 156-159.
101. *ExPASy Proteomics Server*. 2008 [citováno 8.4.2008]; dostupné z: <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>.
102. Scott, K., Hughes, R., *Industrial membrane separation technology*. 1996, Springer.
103. Yip, T.T., Nakagawa, Y., Porath, J., *Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography*. Anal. Biochem., 1989. 183(1): 159-171.
104. *Protein Separations' Handbook Collection*. 2004, Amersham Biosciences.
105. Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V., Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967. 28(5): 815-820.
106. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): 680-685.
107. Gorg, A., Postel, W., Westermeier, R., *Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane*. Anal. Biochem., 1978. 89(1): 60-70.
108. Merril, C.R., *Gel-staining techniques*. Methods Enzymol., 1990. 182: 477-488.
109. Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R., *A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels*. Anal. Biochem., 1980. 105(2): 361-363.
110. Mayer, J.W., *Simple and rapid methods for drying polyacrylamide gels after isoelectric focusing*. Anal. Biochem., 1976. 76(1): 369-373.
111. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1979. 76(9): 4350-4354.
112. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal. Biochem., 1981. 112(2): 195-203.
113. Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., Bishop, J.M., *Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product*. Mol. Cell. Biol., 1985. 5(12): 3610-3616.
114. Melamed, M.R., Mullaney, P.F., Mendelsohn, M.L., *Flow cytometry and sorting*. 1979, Wiley Medical Publication.
115. Freshney, R.I., *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 1994, John Wiley and Sons, Inc.
116. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. 2000, Becton, Dickinson and Company.

117. Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., Nordlund, P., *Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies*. Anal. Biochem., 2006. 357(2): 289-298.
118. Berne, B.J., Pecora, R., *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. 2000, Courier Dover Publications.
119. Zulauf, M., D'Arcy, A., *Light scattering of proteins as a criterion for crystallization*. J. Cryst. Growth, 1992. 122(1-4): 102-106.
120. Ducruix, A., Giege, R., *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins : A Practical Approach (Practical Approach Series)*. 2. ed. 1999, New York: Oxford University Press.
121. Walter, T.S., Diprose, J.M., Mayo, C.J., Siebold, C., Pickford, M.G., Carter, L., Sutton, G.C., Berrow, N.S., Brown, J., Berry, I.M., Stewart-Jones, G.B., Grimes, J.M., Stammers, D.K., Esnouf, R.M., Jones, E.Y., Owens, R.J., Stuart, D.I., Harlos, K., *A procedure for setting up high-throughput nanolitre crystallization experiments. Crystallization workflow for initial screening, automated storage, imaging and optimization*. Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr., 2005. 61(4, část 6): 651-657.
122. Chayen, N.E., *A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals*. J. Appl. Crystallogr., 1997. 30(2): 198-202.
123. D'Arcy, A., Elmore, C., Stihle, M., Johnston, J.E., *A novel approach to crystallising proteins under oil*. J. Cryst. Growth, 1996. 168(1-4): 175-180.
124. Stura, E.A., Wilson, I.A., *Applications of the streak seeding technique in protein crystallization* J. Cryst. Growth, 1991. 110(1-2): 270-282.
125. Bergfors, T., *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*. 1999, La Jolla: International University Line.
126. Garcia-Ruiz, J.M., *Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization*. Methods Enzymol., 2003. 368: 130-154.
127. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., Foeller, C., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5 ed. 1991: Department of Health and Human Services, National Institute of Health
128. Power, B.E., Hudson, P.J., *Synthesis of high avidity antibody fragments (scFv multimers) for cancer imaging*. J. Immunol. Methods, 2000. 242(1-2): 193-204.
129. Wright, A., Morrison, S.L., *Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering*. Trends Biotechnol., 1997. 15(1): 26-32.
130. Studier, F.W., Moffatt, B.A., *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J. Mol. Biol., 1986. 189(1): 113-130.
131. Oelschlaeger, P., Lange, S., Schmitt, J., Siemann, M., Reuss, M., Schmid, R.D., *Identification of factors impeding the production of a single-chain antibody fragment in Escherichia coli by comparing in vivo and in vitro expression*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003. 61(2): 123-132.

132. Galkin, O., Vekilov, P.G., *Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid-liquid phase boundary*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000. 97(12): 6277-6281.
133. Knappik, A., Pluckthun, A., *Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding*. Protein Eng., 1995. 8(1): 81-89.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]